

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia
Departamento de Microbiologia e Imunologia

**CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO FATOR DE COLONIZAÇÃO (FC O25) DE
Escherichia coli I SOLADAS DE COLI BACILOSE NEONATAL BOVINA**

GEÓRGI O FREESZ VALADARES

Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para a obtenção de título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, área de concentração Microbiologia.

Campinas, 2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

V23c	<p>Valadares, Geórgio Freesz Caracterização de um novo fator de colonização (FC O25) de <i>Escherichia coli</i> isoladas de colibacilose neonatal bovina / Geórgio Freesz Valadares. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.</p> <p>Orientador: Domingos da Silva Leite. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Escherichia coli</i>. 2. Diarréia. 3. Bovinos. 4. Fator de colonização. 5 F4(K88). I. Leite, Domingos da Silva. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------------	--

Título em inglês: Characterization of a new colonization factor (CF O25) of *Escherichia coli* isolated from neonatal bovine colibacillosis.

Palavras-chave em inglês: *Escherichia coli*; Diarrhea; Calves; Colonization factor; F4(K88).

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Domingos da Silva Leite, Antônio José Piantino Ferreira, Maria Sílvia Viccari Gatti, Sérgio de Mendonça, Tomomasa Yano.

Data da defesa: 09/11/2006.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 09 de novembro de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite
(Orientador)

Assinatura

Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira

Assinatura

Profa. Dra. Maria Sílvia Viccari Gatti

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio de Mendonça

Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano

Assinatura

Suplentes:

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

Profa. Dra. Marilda Carlos Vidotto

Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Assinatura

*Para Syomara, luz da minha vida,
que me ensinou que o azul não é apenas
mais uma cor, dedico.*

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Para a sua realização nos foi concedida bolsa de doutorado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (00/01399-4).

Agradecimentos:

A Deus, por nos proporcionar a curiosidade para investigarmos sua obra, que ainda assim não conseguimos dar o devido valor.

A meus pais, Jorge e Elizabeth, minhas irmãs, Georgiana e Gabrielli, aos sobrinhos Matheus e Guilherme (que está chegando), pelo amor e dedicação durante toda a minha jornada.

Ao Professor Dr. Domingos, por sua amizade desde o meu primeiro contato com a Microbiologia em 1994, pela sua confiança, dedicação e paciência em relação às minhas intermináveis “perguntas”, o meu muito obrigado.

Ao Professor Dr. Tomomasa Yano, pela tolerância com as minhas falhas, pelo seu interesse constante, auxílio e por colocar a si e o seu laboratório sempre à disposição, e também por fazer parte da banca examinadora.

À Professora Dra. Maria Sílvia Viccari Gatti, pelo exemplo profissional e humano a ser seguido, pelo dom de “ensinar a ensinar”, pela paciência, pelos cuidados e pelas inúmeras contribuições ao meu crescimento, como profissional e como homem, e também por fazer parte da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira pelas contribuições na banca prévia, e por participar da banca examinadora.

Ao Professor Dr. Sérgio de Mendonça por participar da banca examinadora.

Ao Professor Dr. Wanderley D. da Silveira pelas contribuições na banca prévia.

Ao Professor Dr. Paulo Joazeiro e à Antônia M. F. Lima, do Centro de Microscopia Eletrônica do IB, pelos ensinamentos e disponibilidade nos experimentos de microscopia.

À Professora Anete Pereira de Souza, e às doutoras Cleide Catani e Suzeli Tada, e ao grande Mestre Luciano Martins pela ajuda fundamental com os experimentos de clonagem e expressão e purificação protéica.

Ao meu amigo Mário Paulo, pelo tratamento igual com que nos demos, sei que cresci muito com a sua amizade.

À minha amiga Claudia de Moura, porque também espero que nossa amizade dure para sempre.

Ao Erivaldo e à Mirtis, pela amizade e pelo apoio fundamental nos diferentes momentos: na execução e auxílio para a realização dos experimentos e também, como não poderia deixar de ser, nos vários momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório, agradeço à Monique e à Maria Cláudia, também pensando naqueles que já seguiram seus caminhos, por todos os dias agradáveis que passamos juntos, pelas horas de reflexão e pelas horas difíceis que, sendo tão poucas, quase ficaram apagadas quando comparadas com as demais, fazendo muito melhor o ambiente no Laboratório de Antígenos Bacterianos II.

Aos demais colegas, professores e funcionários Instituto de Biologia. Agradeço em especial à Lourdes, secretária do Curso, por sua infindável paciência para comigo, ao lidar com aqueles milhares de pareceres, formulários e afins.

À Unicamp, *minha casa*, lugar onde muita coisa aconteceu e outras aconteceram indiretamente, tudo em razão de ter dirigido meus sonhos a ti, há tanto tempo atrás.

Agradeço também às pessoas, homens e mulheres, que pelo fruto do seu trabalho fazem real a possibilidade da Universidade *pública e gratuita*, e que são a razão de ser e devem ser os beneficiários desta.

"A rã que vive em um poço não sabe o quanto o mar é grande."

Provérbio japonês citado em *Musashi* por Yoshikawa Eiji (1892-1962).

RESUMO

Infecções por *Escherichia coli* são freqüentes em animais domésticos, afetando principalmente animais recém nascidos e no período do pós-desmame, sendo responsáveis por importantes danos econômicos na suinocultura e pecuária de bovinos e ovinos. A instalação da bactéria ao hospedeiro se dá através da colonização, processo mediado por proteínas denominadas adesinas, que se encontram distribuídas por toda a superfície bacteriana. Estas apresentam uma grande variedade morfológica e são coletivamente chamadas de Fatores de Colonização (FCs). Neste trabalho identificamos um novo fator de colonização (FC O25) presente em cepas de *Escherichia coli* isoladas de casos de colibacilose neonatal bovina, que apresenta semelhanças antigênicas com os FCs F4(K88), CS31A e F41 sem, contudo, apresentar identidade genética com estes fatores em ensaios de PCR. Baseados nessas homologias, investigamos a hipótese do FC O25 pertencer a esta família de FCs. Estudamos a seqüência do gene que compõe a subunidade principal do FC O25 com base em semelhanças com genes dos fatores de colonização homólogos e encontramos o FC O25 presente em 35 das 41 cepas em estudo. Verificamos que a proteína FC O25 apresenta 49,7% de homologia com a proteína FaeG (F4), 35,4% com ClpG (CS31A) e 29,4% com FimF41. Com ferramentas de bioinformática determinamos a relação filogenética entre essas proteínas e a estrutura secundária do FC O25. Os estudos de extração de DNA genômico e plasmidial indicaram que o gene FC O25 deve estar localizado no cromossomo bacteriano. Este foi clonado no vetor de expressão pET-151, inserido na linhagem de *E.coli* BL21[DE3]-Star e a proteína do FC O25 foi obtida e purificada e antissoro policlonal mono específico foi obtido em coelho. A proteína do FC O25 purificada foi submetida a ensaios de Western Blotting frente a antissoros anti os FCs F4, F41 e CS31A e verificamos reconhecimento da proteína em diferentes graus. A cepa CG1905-B foi utilizada em ensaios de microscopia eletrônica de transmissão com marcação por anticorpos conjugados com ouro e verificamos que a estrutura do FC O25 é do tipo fibrilar assemelhando-se à estrutura do CS31A. Em ensaios de adesão a linhagens de células eucarióticas *in vitro* observamos adesão às células Caco-2 (carcinoma de cólon humano) e que esta adesão era inibida pelo antissoro anti-FC O25. Os resultados sugerem que o FC O25 pode ser importante para a patogenicidade das *E. coli* bovinas no Brasil, uma vez que encontramos uma associação deste com outros fatores de colonização e, sobretudo com toxinas relacionadas com a patogenia em bovinos, evidenciando novas relações entre mecanismos de virulência que merecem novas investigações, além da própria elucidação completa da estrutura do operon FC O25.

PALAVRAS CHAVE: *Escherichia coli*, diarreia, bovinos, fator de colonização, FC O25, F4 (K88), CS31A, F41.

ABSTRACT

Infections from *Escherichia coli* are frequent in domestic animals, affecting mainly newborn animals in the post weaning period, being thus responsible for important economic losses in the cattle, porcine and lamb herds. The establishment of the bacterium in the host is made by colonization and it is a process mediated by proteins called adhesins that are distributed along the bacterial surface. They present a great morphological variety and are called Colonization factors (CFs). Our objective in this work was to identify the new colonization factor (CF O25) in *Escherichia coli* strains isolated from bovine neonatal colibacillosis, this CF O25 presents antigenic similarities with the FCs F4(K88), CS31A and F41 without, however, present genetic identity to these factors in PCR assays. Based in these homologies, we investigated the hypothesis of the NFC be a member of this "family" of CFs. So we studied the sequence of the CF O25's main subunit gene and its similarities with the genes of the homologous CFs (F4, F41 and CS31A) in polymerase chain reaction (PCR) assays. We found the CF O25 in 35 of the 41 studied strains. Through DNA sequencing, we verified that CF O25 protein presents 49.7% of homology with FaeG protein (F4), 35.4% with ClpG (CS31A) and 29.4% with FimF41. Using bioinformatics tools we determined the phylogenetic relationships between these proteins and the secondary structure of the CF O25. The genomic and plasmid DNA extraction assays indicates that the CF O25 gene is located in the bacterial chromosome. The CF O25 gene was cloned in the pET-151 expression vector, inserted in the *E.coli* BL21[DE3]-Star strain and the CF O25 protein was over expressed, purified and monospecific antiserum was obtained in rabbits. The purified CF O25 protein was submitted to Western Blotting assays with antiserum against the FCs F4, F41 and CS31A and we verified recognition of the CF O25 in different degrees. The CG1905-B strain was used in the assays of electronic transmission microscopy using immunogold. The structure of the PCF is fibrillar resembling it the structure of the CS31A. This strain also was submitted the assays of adhesion to the eukaryotic culture cells and we observed adhesion to the Caco-2 cells (human colon carcinoma), this adhesion could be inhibited by anti-CFO25 antiserum. Our results suggest that the CF O25 can be important for the bovine pathogenicity of *E. coli* in Brazil, since we found CF O25 associated with other colonization factors and toxins, related with patogenicity in bovines, evidencing new relationships between virulence mechanisms that deserve new investigations, as well the elucidation of the complete structure of CF O25 operon.

KEYWORDS: *Escherichia coli*, diarrhea, calves, colonization factor, CF O25, F4 (K88), CS31A, F41.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO.....	1
- <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC).....	4
- <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC).....	5
- <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC).....	7
- <i>Escherichia coli</i> EnteroAgregativa (EAEC).....	8
- <i>Escherichia coli</i> Difusamente Aderente (DAEC).....	10
- <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC).....	11
Enterotoxina termo-lábil do tipo 1 (LT-I).....	12
Enterotoxina termo-lábil do tipo 2 (LT-II).....	13
Enterotoxina termo-estável do tipo 1 (ST-I ou ST-a).....	13
Enterotoxina termo-estável do tipo 2 (ST-II OU ST-b).....	14
- Toxina Citoletal Distensora (CDT).....	15
- Fatores Necrosantes Cytotóxicos (CNFs).....	16
- Fatores de colonização.....	18
- Morfologia das fímbrias.....	19
2 - OBJETIVOS.....	26
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 - Cepas bacterianas.....	27
3.1.1 - Linhagens padrão.....	27
3.1.2 - Cepas de campo.....	28

3.2 - Desenho de iniciadores para os genes adjacentes ao gene principal do PFC.....	30
3.3 - Padronização dos ensaios da reação de polimerase em cadeia (PCR) para detecção dos genes responsáveis pela subunidade principal do PFC.....	31
3.3.1 – Obtenção do DNA bacteriano.....	31
3.3.2 – Ensaios de PCR.....	33
3.4. - Eletroforese em gel de agarose.....	33
3.5 - Reações de seqüenciamento dos produtos de PCR.....	34
3.6 - Alinhamento das seqüências obtidas com as seqüências descritas para diferentes fatores de colonização existentes em <i>Escherichia coli</i> de origem animal.....	34
3.6.1 - Alinhamento com os genes da subunidade principal do F4, F41 e CS31A.....	34
3.6.2 - Determinação das relações filogenéticas entre as proteínas das subunidades principais dos FCS: F4, F41, CS31A e PFC.....	35
3.7 - Ensaios de reação da polimerase em cadeia (PCR) para clonagem do gene responsável pela subunidade principal do PFC.....	36
3.7.1 - Obtenção do DNA bacteriano.....	36
3.7.2 - Ensaios de PCR.....	36
3.8 - Ensaios para determinação da localização do gene para a subunidade principal do PFC no genoma das cepas de <i>E. coli</i> envolvidas no estudo.....	37
3.9 - Transformação e clonagem dos produtos de PCR.....	37
3.9.1 - Reação de ligação vetor-inserto.....	38
3.9.2 - Experimentos de transformação das <i>E. coli</i> TOP10.....	38
3.9.3 - Seleção dos clones positivos.....	38
3.9.4 - Experimentos de transformação das <i>E.coli</i> BL21 Star(DE3).....	39

3.10 - Expressão da proteína PFC.....	39
3.11 - Purificação da proteína do PFC.....	39
3.11.1 - Purificação em coluna de afinidade.....	40
3.12 - Diálise das frações e dosagem de proteínas.....	40
3.13 - Preparação das amostras para eletroforese.....	40
3.14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (EGPA-SDS).....	41
3.15 - Fixação e coloração dos géis.....	41
3.16 - Obtenção de antissoro monoespecífico.....	42
3.16.1 - Absorção dos antissoros.....	42
3.17 - Western blotting.....	43
3.18 - Ensaio de microscopia eletrônica.....	43
3.19 - Ensaio de PCR para detecção da fímbria do tipo 1.....	44
3.20 - Ensaio de adesão nas linhagens celulares Caco-2, Hela, Hep-2 e HT-29.....	44
3.20.1 - Preparo das cepas bacterianas.....	44
3.20.2 - Preparo das células eucarióticas.....	45
3.20.3 - Ensaio de adesão.....	45
3.20.4 - Ensaio de inibição de adesão usando antissoro anti-PFC.....	46
3.20.4.1 - Diluição do antissoro e dos cultivos bacterianos.....	46
3.21 - Análises da estrutura secundária da proteína PFC.....	47
4 - RESULTADOS.....	48
4.1 - Seleção dos iniciadores para o gene principal do PFC.....	48
4.2 - Ensaio de PCR com os iniciadores desenhados.....	50
4.3 - Padronização das condições de reação nos ensaios de PCR.....	54

4.4 - PCR das cepas de campo para detecção do gene do PFC.....	55
4.5 - Localização do gene para a subunidade principal do PFC.....	56
4.6 - Ensaio de seqüenciamento.....	56
4.7 - Resultado das comparações com os genes para F4, F41 e CS31A.....	59
4.8 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos.....	60
4.9 - Ensaio de PCR para clonagem do gene responsável pela subunidade principal do PFC.....	66
4.10 - Experimentos de transformação e clonagem dos produtos de PCR.....	66
4.11 - Expressão e purificação da proteína do PFC.....	67
4.12 - Western blotting.....	68
4.12.1 - Western blotting da proteína PFC frente a diversos antissoros.....	69
4.13 - Ensaio de microscopia eletrônica.....	70
4.13.1 - Marcação com ouro coloidal.....	72
4.14 - Ensaio de PCR para detecção da fímbria do tipo 1.....	73
4.15 - Ensaio de adesão em culturas celulares Caco-2, Hela, Hep-2 e HT-29.....	75
4.16 - Estudos da estrutura secundária da proteína PFC.....	81
5 - DISCUSSÃO.....	87
6 - CONCLUSÕES.....	100
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

ANEXO A: Certificado de aprovação da Comissão Interna de Biossegurança.....	111
ANEXO B: Certificado de aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	112
ANEXO C: Cópia do depósito da seqüência do gene FC O25 submetido ao Genbank.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura do operon <i>fae</i> do F4 de <i>E. coli</i>	31
FIGURA 2: Modelo da região onde foram alinhados os iniciadores (com base no operon <i>fae</i>).....	31
FIGURA 3: Seqüência dos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR para fins de clonagem.....	37
FIGURA 4: Alinhamento dos genes <i>faeF</i> e <i>clpF</i> de <i>E. coli</i>	48
FIGURA 5: Alinhamento dos genes <i>faeH</i> e <i>clpH</i> de <i>E. coli</i>	49
FIGURA 6: Seqüência dos iniciadores, combinações utilizadas e tamanhos esperados dos produtos amplificados.....	50
FIGURA 7: PCR da cepa padrão F4+ de <i>E. coli</i> , frente à diferentes combinações dos iniciadores.....	51
FIGURA 8: PCR da cepa padrão F4+ de <i>E. coli</i> , com diferentes combinações dos iniciadores.....	52
FIGURA 9: PCR da cepa padrão CS31A+ de <i>E. coli</i> , com diferentes combinações dos iniciadores.....	52
FIGURA 10: PCR da cepa padrão CS31A+ de <i>E. coli</i> , com diferentes combinações dos iniciadores.....	53
FIGURA 11: PCR da cepa padrão B41M (F41+) de <i>E. coli</i> , com diferentes combinações dos iniciadores.....	53
FIGURA 12: PCR da cepa padrão B41M (F41+) de <i>E. coli</i> , com diferentes combinações dos iniciadores.....	54

FIGURA 13: PCR da linhagem F4+ de <i>E. coli</i> com os iniciadores P4 e P5 em gradiente de temperatura.....	55
FIGURA 14: PCR das cepas de campo com os iniciadores P4 e P5.....	56
FIGURA 15: Seqüência (5'-3') de nucleotídeos do gene que codifica a subunidade principal do PFC.....	58
FIGURA 16: Seqüência deduzida de aminoácidos da proteína da subunidade principal do PFC.....	59
FIGURA 17: Alinhamento entre os aminoácidos da proteína da subunidade principal do PFC com aqueles da proteína FaeG (F4) de <i>E. coli</i>	61
FIGURA 18: Alinhamento entre os aminoácidos da proteína da subunidade principal do PFC com aqueles da proteína ClpG (CS31A) de <i>E. coli</i>	62
FIGURA 19: Alinhamento entre os aminoácidos da proteína da subunidade principal do PFC com aqueles da proteína FimF41 (F41) de <i>E. coli</i>	63
FIGURA 20: Alinhamento entre os aminoácidos da proteína da subunidade principal do PFC com aqueles da proteína FimA (Fímbria do Tipo 1) de <i>E. coli</i>	64
FIGURA 21: Árvore filogenética preparada a partir das seqüências de aminoácidos das subunidades principais de diferentes fatores de colonização de <i>E. coli</i>	65
FIGURA 22: PCR das cepas de <i>E. coli</i> CG1903-D e CG1905-B com os iniciadores TOPO-A e TOPO-B.....	66
FIGURA 23: Gel da extração plasmidial das linhagens TOP10 e BL21 Star (DE3).....	67
FIGURA 24: EGPA-SDS das diferentes etapas da extração protéica.....	68
FIGURA 25: Membrana revelada da EGPA-SDS do extrato bruto da proteína PFC.....	69
FIGURA 26: Membrana revelada da EGPA-SDS da proteína PFC purificada.....	69

FIGURA 27: Micrografia da cepa <i>de E. coli</i> CG1905-B cultivada a 16°C.....	70
FIGURA 28: Micrografia da cepa <i>de E. coli</i> CG1905-B cultivada a 37°C.....	71
FIGURA 29: Micrografia da cepa <i>de E. coli</i> CG1905-B cultivada a 37°C.....	71
FIGURA 30: Micrografia da cepa <i>de E. coli</i> CG1905-B cultivada a 37°C.....	72
FIGURA 31: Micrografia da cepa <i>de E. coli</i> CG1905-B cultivada a 16°C.....	73
FIGURA 32: Padrões de adesão a células Caco-2.....	76
FIGURA 33: Padrões de adesão a células Caco-2.....	77
FIGURA 34: Padrões de adesão a células Caco-2.....	78
FIGURA 35: Experimento de inibição de adesão da cepa CG-1905-B de <i>E.coli</i> a células Caco-2.....	79
FIGURA 36: Experimento de inibição de adesão cepa CG-1905-B de <i>E.coli</i> a células Caco-2.....	80
FIGURA 37: Resultado da previsão da estrutura secundária da Proteína PFC.....	82
FIGURA 38: Resultado da previsão da estrutura secundária da Proteína FaeG(F4).....	83
FIGURA 39: Resultado da previsão da estrutura secundária da Proteína ClpG(CS31A).....	84
FIGURA 40: Representação da proteína PFC como previsto pelo programa PSIPRED.....	85
FIGURA 41: Resultado do alinhamento entre as previsões da estrutura secundária das Proteínas PFC e FaeG(F4).....	86

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 01: Características dos FC de <i>E. coli</i> de origem animal.....	20
QUADRO 02: Sorotipos e fatores de virulência das cepas de <i>E. coli</i>	29
QUADRO 03: Matriz de similaridade entre os diferentes fatores de colonização presentes em <i>E. coli</i> de origem animal e o PFC.....	60
QUADRO 04: Fatores de virulência e sorotipos das cepas PFC positivas.....	74

Introdução

1 - INTRODUÇÃO:

Os seres humanos e animais são desprovidos de microbiota gastrointestinal até o nascimento. O feto no útero é normalmente estéril e se torna colonizado com microrganismos presentes no canal do parto, no ambiente imediatamente ao seu redor e de outros sítios da sua mãe. Em poucos dias, muitos desses microrganismos são eliminados, ocorrendo uma sucessão bacteriana, quer quantitativa como qualitativa na microbiota. Bactérias láticas e coliformes são os microrganismos predominantes no trato intestinal dos recém-nascidos mas, durante o desmame, a microbiota muda drasticamente e prevalecem as bactérias anaeróbicas estritas. Dessa forma a microbiota dos indivíduos adultos consiste de comunidades “clímax” relativamente estáveis. O ecossistema gastrointestinal é, contudo, único entre os diferentes órgãos: ele contém cerca de 10 vezes mais bactérias que o número total de células do corpo (10^{14} bactérias, contra 10^{13} células em um ser humano adulto) e sua composição varia de acordo com a idade, dieta e estado de saúde do indivíduo (BERG, R. D., 1996).

O intestino grosso abriga entre 10^{10} a 10^{11} bactérias por grama de conteúdo intestinal, onde se acredita que existam de 400 a 500 gêneros de organismos, dos quais 40% ainda não cultivados em laboratório. É importante enfatizar que 99,9% da microflora gastrointestinal é composta por bactérias exclusivamente anaeróbicas. Dessa forma os anaeróbicos (por exemplo, *Bacterioides fragilis*) são de 100 a 1000 vezes mais numerosos que os anaeróbicos facultativos, como, por exemplo, *Escherichia coli* e outros coliformes, que são os organismos normalmente cultivados como indicadores de contaminação fecal humana. Estudos quantitativos das inter-relações entre o hospedeiro e a microbiota gastrointestinal têm sido prejudicados pela complexidade, variabilidade e incapacidade de se cultivar muitas dessas bactérias.

Evidências sugerem que a complexa associação da microbiota desempenhe funções essenciais, tais como: contribuir para a nutrição do hospedeiro, liberar e gerar compostos mais simples, como carboidratos, aminoácidos e vitaminas, sendo o potencial metabólico da microbiota comparável ao do fígado humano (BERG, R. D., 1996). Adicionalmente, esta influencia o ambiente intestinal pelo estímulo à vascularização e desenvolvimento das vilosidades, propicia o desenvolvimento do sistema imune e, através da competição, dificulta a colonização do trato intestinal por bactérias patogênicas exógenas (GILMORE & FERRETTI, 2003).

Em 1885, o pediatra alemão Theodore Escherich descreveu pela primeira vez uma bactéria presente em fezes de adultos saudáveis, que foi denominada *Bacterium coli commune*; em 1919. Em uma revisão da nomenclatura, Castellani & Chalmers, no seu Manual de Medicina Tropical, renomearam a espécie para *Escherichia coli*, para homenagear o seu descobridor. Este termo foi oficialmente aceito em 1958 (KUHNER *et al.*, 2000, LEDERBERG, J., 2004).

O gênero *Escherichia*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é composto por bacilos gram-negativos, com tamanho variável e diâmetro das células ao redor de um micrômetro, não são esporulados e em sua maioria apresentam cápsula. São geralmente móveis, com flagelos peritríquios, anaeróbicos facultativos, fermentam glicose com produção de gás, são catalase positivos, oxidase negativos e reduzem nitrato a nitrito (SUSSMAN, M., 1997).

No gênero *Escherichia*, além da *Escherichia coli*, existem atualmente outras cinco espécies (BETTELHEIM, K.A., 1994; HUYS *et al.*, 2003):

- *Escherichia albertii*, isolada de fezes diarréicas de uma criança de Bangladesh em 2003;
- *Escherichia blattae*, isolada do intestino posterior da barata *Blatta orientalis*, não tendo sido encontrada em outros organismos até então;
- *Escherichia fergusonii*, isolada de fezes, sangue e urina em seres humanos além de outros animais como bovinos, suínos, eqüinos e aves;
- *Escherichia hermannii*, isolada de fermentos, fezes, sangue e fluído cérebro-espinhal de seres humanos e
- *Escherichia vulneris*, isolada de fermentos e de fezes de seres humanos.

Escherichia coli possuem diferentes grupos antigênicos que as identificam: os antígenos lipopolissacarídicos somáticos, constituintes da membrana externa da parede celular bacteriana (antígenos O) determinam o chamado “sorogrupo”; os antígenos polissacarídicos presentes na cápsula (antígenos K) e os antígenos protéicos flagelares (antígenos H). Esses formam a base do esquema de tipagem introduzido por Fritz Kaufmann, em 1947, continuamente expandido desde então. A combinação específica de antígenos O e H define o “sorotipo” de um isolado e *E. coli* de determinados sorogrupos e sorotipos podem ser associadas a certas síndromes clínicas, servindo como marcadores identificáveis que podem ser correlacionados com certas linhagens virulentas (SUSSMAN, M., 1997).

Escherichia coli coloniza o trato gastrintestinal dos recém-nascidos poucas horas após o nascimento e, posteriormente, a bactéria e o hospedeiro vivem em simbiose. *E. coli* normalmente permanecem inofensivas no lúmen intestinal. Contudo, quando o hospedeiro encontra-se debilitado ou imunossuprimido, ou quando barreiras gastrintestinais são violadas, até mesmo linhagens não patogênicas, que fazem parte da microbiota, podem causar doenças. Além disso, algumas linhagens são patogênicas e responsáveis por patogenias entéricas, no homem e nos animais, tais como diarreia, disenteria e colite hemorrágica. Complicações a partir destas, como uremia hemolítica e doença do edema ou, ainda, infecções extraintestinais, tais como infecções do trato urinário, septicemias, meningites, peritonites e infecções pulmonares (BLANCO *et al.*, 1993).

Como a maioria dos patógenos de mucosas, pode-se dizer que *E. coli* seguem uma estratégia para a infecção: i) colonização da mucosa, ii) evasão das defesas do hospedeiro, iii) multiplicação e, iv) dano ao hospedeiro. A característica mais conservada entre as linhagens que causam doenças entéricas é a habilidade de colonizar a mucosa intestinal, evitando sua expulsão pela ação do movimento peristáltico intestinal e assim competir com a flora estabelecida no intestino, incluindo-se aí outras linhagens de *E. coli*. Sua via de transmissão geralmente é fecal-oral, por meio de água e alimentos contaminados (NATARO & KAPER, 1998).

Dos 185 sorogrupos (classificados pelo antígeno O) até hoje descritos para *E. coli* (*The International Escherichia and Klebsiella Center - WHO - Statens Serum Institut,*

Copenhague, Dinamarca), aproximadamente 60 são reconhecidos como organismos patogênicos (DUNCAN & HACKNEY, 1994; MOLEND, J.R., 1994). Vários destes sorogrupos foram agrupados em seis categorias, de acordo com as características clínicas observadas nas manifestações diarréicas, propriedades de virulência da *E. coli*, tipo de interação com a mucosa intestinal, além das diferenças epidemiológicas apresentadas (REED, G.H., 1994, SALYERS & WHITT, 1994). Essas categorias são:

- *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC);
- *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC);
- *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC);
- *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC);
- *Escherichia coli* de Aderência Difusa (DAEC);
- *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC).

***Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC):**

Como primeiro patotipo a ser descrito, EPEC é uma categoria importante de *E. coli* diarréica que está associada com diarréia infantil e diarréia persistente em países em desenvolvimento. Também está associada com doenças em coelhos, as chamadas REPEC, bezerros, porcos e cães, mas os sorogrupos encontrados nestes animais não costumam ser detectados em humanos (NATARO & KAPER, 1998).

As infecções por EPEC são encontradas primariamente em crianças menores de dois anos. Em crianças mais velhas, EPEC pode ser isolada também de indivíduos saudáveis. Em voluntários adultos, pode-se causar diarréia através da administração de um inóculo de EPEC e neutralização do suco gástrico com íons bicarbonato. Não se sabe se a dose necessária para infectar crianças é menor, mas presume-se que sim em virtude da perda de receptores específicos em crianças mais velhas e em adultos (SALYERS & WHITT, 1994).

Como outras *E. coli* diarreioagênicas, a transmissão das EPEC se dá por via oral-fecal, através de mãos, utensílios, alimentos e água contaminados. O reservatório das EPEC seriam crianças doentes e saudáveis e adultos portadores assintomáticos. Em portadores sintomáticos as EPEC podem ser isoladas das fezes até mesmo duas semanas após o fim dos sintomas (NATARO & KAPER, 1998).

A principal característica das infecções por EPEC é uma lesão histopatológica no intestino humano, que envolve destruição das microvilosidades e adesão íntima da bactéria à membrana do enterócito com formação de um “pedestal”, resultante do rearranjo de actina F, miosina e outros elementos do citoesqueleto, no qual a bactéria se aloja. Este tipo de lesão é denominado “Attaching-Effacing” (A/E) e requer a expressão de vários genes de virulência (SEARS & KAPER, 1996).

Assim, a diarreia provavelmente advém de múltiplos fatores, levando à secreção ativa de íons, aumento da permeabilidade e inflamação intestinal, além da perda da superfície absorptiva, resultante da destruição das microvilosidades pela lesão A/E (KAPER *et al.*, 2004).

***Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC):**

EHEC, também conhecida como *E. coli* produtora da toxina “Shiga-like” (SLT ou Stx) ou Verotoxigênica (VT), foi reconhecida como agente etiológico de doença em seres humanos em 1982 e produz uma variedade de síndromes clínicas, incluindo diarreia sanguinolenta ou não, colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (HUS). Colite hemorrágica e diarreia em bezerros foram associadas com amostras produtoras de Stx por CHANTER *et al.* (1986).

O principal reservatório de EHEC é o trato intestinal de bovinos e os primeiros casos da doença em humanos estavam relacionados com o consumo de carne bovina mal-cozida, embutidos, derivados de leite e água contaminados (KAPER *et al.*, 2004).

As linhagens EHEC causam a mesma lesão Attaching-Effacing que é observada em EPEC e da mesma forma que EPEC, as EHEC contêm o *locus* LEE (de *locus of enterocyte effacement*). Amostras EHEC produzem uma ou mais toxinas Stx, que estão entre as mais potentes de todas as toxinas bacterianas. Estas toxinas são tidas como as responsáveis pelas características clínicas observadas durante as infecções por EHEC. A família das toxinas “Shiga” possui dois grupos denominados toxinas do tipo 1, produzidas pela *Shigella dysenteriae* do tipo 1, e Shiga-like toxins – Stx-I e Stx-II, codificadas por bacteriófagos. A toxina Stx-I é essencialmente idêntica à toxina Tipo 1 de Shiga. A holotoxina Shiga contêm uma única subunidade A de aproximadamente 32.000 Daltons (32 kDa) associada com um pentâmero de subunidades B com 7,7 kDa

cada. A subunidade B liga-se a um glicolípido da membrana, globotriaosilceramide ou Gb3. A subunidade A tem atividade N-glicosidase, que cliva um resíduo de adenina do RNA 28s que compõe o ribossomo eucariótico, resultando na inibição da síntese protéica e levando a célula à morte (SEARS & KAPER, 1996).

As subunidades A e B das Stx-I e Stx-II são, respectivamente, 55% e 57% idênticas na sua seqüência prevista de aminoácidos. Existem variações entre a Stx-II e o subtipo Stx-IIv, que se liga preferencialmente ao Gb4 e é responsável pela doença do edema (DE) em porcos, com vários sinais clínicos, mas caracterizando-se pela presença de edema e sintomas neurológicos. Stx é produzida no cólon e, através da corrente sanguínea chega até os rins, onde danifica as células endoteliais e obstrui a vascularização pela combinação de toxicidade direta e de inflamação renal, pela indução da produção local de citocinas e quimiocinas. Esses danos podem levar à HUS, que é caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e, potencialmente, a uma falha renal aguda que pode ser fatal. Stx também induz apoptose em enterócitos e causa danos localizados no cólon, resultando em diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, necrose e perfuração intestinal (GANNON & GILES, 1990).

A contribuição das Stx para a diarreia não sanguinolenta observada nas infecções por EHEC é incerta. Contudo observa-se acúmulo de fluído e danos histológicos em alças ligadas de coelhos inoculadas com Stx. Em contraste, Stx administrada por via oral a coelhos recém-nascidos resulta freqüentemente em diarreia intensa e hemorrágica, danos ao cólon, com intensa infiltração neutrofílica. As Stx não têm efeito na secreção aniônica, mas diminuem a absorção de NaCl, sugerindo que induzem acúmulo de fluído pela morte seletiva de células absorptivas das vilosidades, reduzindo a absorção de fluído e expondo a secreção aniônica basal. Contudo, mesmo na ausência das Stx, a infecção pelas EHEC pode alterar o transporte de íons pelas células intestinais, sugerindo que a patogênese da secreção intestinal deva envolver fatores de virulência adicionais. Apesar de as EHEC possuírem a região LEE de EPEC, dados iniciais identificaram similaridades quanto ao desenvolvimento das lesões A/E, porém com diferenças no grau em que estas lesões aparecem. Além disso, há evidências de que a maioria das EHEC O157:H7 produz a enterotoxina termo estável

de *E.coli* Enteroagregativa do tipo 1 (EAST-I), que pode contribuir para a secreção intestinal nestas infecções (SEARS & KAPER, 1996).

Apesar de mais de 200 sorotipos de *E. coli* serem capazes de produzir Stx, a maioria deles não possui o LEE e não estão associados a doenças em seres humanos. Isso levou à adoção da denominação *Escherichia coli* produtora da toxina do tipo Shiga (STEC) ou *E. coli* verotoxigênica (VTEC), como termos gerais para qualquer linhagem de *E. coli* produtora de Stx. Contudo, existem linhagens STEC (LEE negativas) causadoras de doenças em seres humanos, por exemplo, O103:H21, demonstrando assim que existem fatores de virulência adicionais ainda não caracterizados (KAPER *et al.*, 2004).

***Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC):**

EIEC são bioquimicamente, geneticamente e patogenicamente bastante próximas de *Shigella spp.*, sendo encontradas apenas em seres humanos. EIEC podem causar colite invasiva inflamatória e, ocasionalmente, disenteria, mas na maioria dos casos, causa diarreia aquosa indistinguível daquelas causadas por outros tipos de *E. coli* (KAPER *et al.*, 2004).

A fase inicial da patogênese por EIEC envolve a invasão da célula epitelial, seguida de lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimento direcional através do citoplasma e passagem para células epiteliais adjacentes. A movimentação dentro do citoplasma é mediada pela nucleação da actina celular formando uma “cauda” que se estende a partir de um pólo da bactéria. Além da invasão e disseminação dentro das células epiteliais, EIEC também induzem apoptose em macrófagos infectados.

A capacidade destas linhagens de invadir células é conferida por genes de virulência presentes em um plasmídeo de 140MDs (*pInv*) e a invasão provavelmente contribui para a doença disentérica (KAPER *et al.*, 2004). Esse plasmídeo codifica um sistema de secreção do tipo III e uma proteína de membrana externa de 120 kDa chamada IcsA, que promove a nucleação da actina. O crescimento desses microfilamentos induz o movimento da bactéria dentro do citoplasma; esse movimento culmina na formação de protuberâncias que são engolfadas pelas células epiteliais vizinhas, após o que todo o processo é repetido; apesar disso a disseminação das EIEC

para além da camada submucosa é rara. Ainda não se conhece as causas da diarreia associada a estas linhagens. Contudo, alguns estudos demonstram que filtrados de cultura de EIEC estimulam secreção moderada, sem danos histológicos, em alças ligadas de intestino de coelhos. A atividade destes filtrados foi denominada EIET (de enterotoxina enteroinvasiva), mas ainda não pode ser associada a uma única proteína (FASANO *et al.*, 1990).

Muito da patogênese das EIEC parece ser resultado dos múltiplos efeitos do sistema de secreção do tipo III, que secreta muitas proteínas, tais como IpaA, IpaB, IpaC e IpaD, que são mediadoras de eventos de sinalização nos enterócitos, rearranjos do citoesqueleto, internalização da bactéria, lise do vacúolo endocítico, entre outras funções (KAPER *et al.*, 2004), sendo também associada a uma toxina denominada ShET2 (de enterotoxina 2 de *Shigella flexneri*) codificada por plasmídeo, além de uma segunda toxina ainda não caracterizada. Outros fatores de virulência foram descritos, incluindo uma protease de serina, SepA, um sistema para aquisição de ferro – aerobactina, e outras proteases. Além disso, linhagens de EIEC secretam uma citotoxina com peso molecular inferior a 30 kDa que possui pouca citotoxicidade em células Vero (rim de macaco verde africano) e cujo papel na patogenia ainda é desconhecido (SEARS & KAPER, 1996).

***Escherichia coli* EnteroAgregativa (EAEC):**

EAEC, que também só ocorrem em seres humanos, são causa de diarreia persistente em crianças e adultos por todo o mundo. Atualmente, define-se EAEC como sendo linhagens de *E coli* que não secretam enterotoxinas termo-lábeis (LTs) ou termo-estáveis (STs) e que aderem à linhagem Hep-2 (células de carcinoma de laringe humana) em um padrão conhecido como “autoagregativo” onde as bactérias aderem umas às outras em uma configuração que lembra “tijolos empilhados”. É provável que esta definição envolva tanto clones patogênicos como não patogênicos e ainda permanece a dúvida se todas as EAEC possuem fatores em comum que contribuam para esse fenótipo de aderência. Apesar disso, pelo menos um subconjunto é patogênico. A estratégia básica das infecções por EAEC envolve a colonização da mucosa intestinal, predominantemente no cólon, seguida pela secreção de

enterotoxinas e citotoxinas, induzindo danos na mucosa, além do fato de algumas linhagens serem capazes de uma limitada invasão da superfície da mucosa (KAPER *et al.*, 2004).

O achado histopatológico mais proeminente no processo é a presença de grossa camada de bactérias autoagregadas aderidas por toda a superfície da mucosa. Verificou-se que linhagens padrão de EAEC aderem a células Hep-2 e da mucosa por intermédio de estruturas fimbriais conhecidas como fímbrias de aderência agregativa ou AAFs (AAF/I, AAF/II e AAF/III), que são relacionadas com a família das adesinas Dr (TORRES *et al.*, 2005).

Uma proteína recentemente descoberta, chamada dispersina forma uma camada na superfície da bactéria e parece “limitar” os fortes efeitos agregativos das AAFs, talvez, facilitando assim a dispersão através da superfície da mucosa ou a penetração da bactéria na camada de muco. Uma outra estrutura de superfície que está potencialmente envolvida na inflamação é a proteína flagelina de EAEC, que induz a liberação de interleucina-8. Como no caso das EPEC, a liberação dessa citocina estimula a transmigração de neutrófilos através do epitélio o que pode, por si só, levar a danos teciduais e secreção de fluídos (KAPER *et al.*, 2004).

Outras toxinas têm sido descritas para EAEC: uma protease autotransportadora com atividade de mucinase chamada Pic e uma enterotoxina conhecida como enterotoxina 1 de *Shigella* (ShET1). O modo de ação dessa última ainda não foi esclarecido, mas ela deve contribuir com a diarreia que acompanha as infecções por EAEC (KAPER *et al.*, 2004).

A enterotoxina termo-estável estável de EAEC (EAST-I) foi a primeira a ser descrita, é uma proteína de 4,1 kDa codificada pelo gene plasmidial *astA*. Apresenta cerca de 50% de homologia na seqüência de aminoácidos com a enterotoxina termo-estável do tipo 1 (ST-I) de ETEC, mas é distinta tanto genética, quanto antigenicamente, à ST-I. EAST-I estimula o acúmulo de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) na mucosa intestinal (YAMAMOTO & ECHEVERRIA, 1996). Além das EAEC, a toxina EAST-I também está presente em cepas EHEC, ETEC e EPEC, sendo particularmente forte a associação encontrada entre essa toxina e cepas ETEC produtoras do fator de colonização F4 em amostras isoladas de leitões, e com as

linhagens ETEC de origem humana portadoras do fator de colonização CFA/II (BERTIN *et al.*, 1998).

Muitas linhagens de EAEC secretam uma toxina autotransportadora chamada Pet, codificada no mesmo plasmídio onde se encontra o AAF. A Pet apresenta atividade enterotóxica e pode, potencialmente, pela clivagem da proteína do citoesqueleto espectrina, levar a mudanças nesta estrutura e arredondamento das células epiteliais (KAPER *et al.*, 2004).

***Escherichia coli* Difusamente Aderente (DAEC):**

O termo difusamente aderente (DA) foi utilizado para designar *E. coli* que apresentavam adesão às células HEp-2 mas não formavam as microcolônias características das EPEC. Com a descoberta das EAEC, a maioria dos autores reconhece as DAEC como uma categoria independente de *E. coli* potencialmente diarreiogênicas (NATARO & KAPER, 1998).

Vários estudos incluem as DAEC como agentes de diarreia, enquanto em outros não foi relatado o isolamento de um número maior de amostras de casos de diarreia do que em controles assintomáticos. Uma possível explicação para isso está no fato de haver uma relação com a idade dos pacientes, pois a quantidade de casos de diarreia por DAEC é maior em crianças mais velhas (4-5 anos) do que naqueles bebês com até um ano de idade. A maioria dos pacientes infectados com DAEC apresentava diarreia aquosa com ausência de sangue ou leucócitos fecais (NATARO & KAPER, 1998).

Pouco se conhece das características patogênicas das DAEC. Uma fímbria que media o fenótipo DA foi caracterizada. Os genes que codificam essa fímbria (denominada F1845) podem ser encontrados tanto no cromossomo bacteriano como em um plasmídio, com cerca de 75% dos isolados apresentando-se positivas quando testadas com uma sonda para este fator. Esses genes fimbriais apresentam homologia com genes das adesinas bacterianas do grupo Dr, presentes em *E. coli* uropatogênicas. Também foi descrita uma proteína de membrana externa (OMP) de 100 kDa que está associada com o fenótipo DA. Este fator é expresso somente por uma minoria dos isolados de DAEC (NATARO & KAPER, 1998).

***Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC):**

ETEC constituem um dos principais grupos dentro das *E. coli* que causam diarreia. São consideradas as maiores causa de diarreia infantil, dentre os agentes bacterianos, em países subdesenvolvidos e o agente mais relacionado à diarreia dos viajantes. Em países desenvolvidos é raro encontrar casos de diarreia associados a ETEC. Apesar disso, ocasionalmente, ocorrem surtos em hospitais e creches (BLANCO & BLANCO 1993). Em animais domésticos as colibaciloses são freqüentes, afetando principalmente animais recém-nascidos e no período do pós-desmame, sendo responsáveis por importantes danos econômicos na suinocultura e pecuária bovina e de ovinos (GYLES, C. L., 1986; HOLLAND, R. E., 1990).

Linhagens de ETEC foram inicialmente reconhecidas como causadoras de diarreia em leitões e também por causarem infecções letais em animais recém-nascidos. Estudos das ETEC em leitões foram os primeiros a elucidar os mecanismos da doença, incluindo a existência de duas enterotoxinas codificadas por genes plasmidiais. As primeiras descrições de ETEC em humanos relatam isolados de fezes de crianças com diarreia que eram capazes de causar acúmulo de fluido em alças ligadas de coelhos (NATARO & KAPER, 1998).

ETEC causam diarreia pela combinação de dois de seus fatores de virulência: i) expressar adesinas específicas na sua superfície, que permitem a aderência e colonização do epitélio intestinal e ii) produzir enterotoxinas que dão início ao estado secretório, ou à diarreia propriamente dita (GYLES, C. L., 1986; HOLLAND, R. E., 1990; BLANCO *et al.*, 1993).

A adesão do microrganismo constitui o primeiro passo na maioria das infecções bacterianas, que não é um fenômeno aleatório, é uma associação específica na qual ocorre um reconhecimento mútuo entre o patógeno e as células do hospedeiro. Este reconhecimento é possível graças à existência de estruturas na superfície bacteriana que facilitam a ligação entre a bactéria e receptores na célula hospedeira, mediante uma interação do tipo chave-fechadura (BLANCO *et al.*, 1993). Esta interação permite às ETEC colonizar e proliferar na mucosa intestinal do hospedeiro, evitando a ação de arraste do peristaltismo intestinal. A adesão está associada à presença de filamentos protéicos expressos por toda a superfície bacteriana, denominados Fatores de

Colonização (FCs). Esses consistem de estruturas rígidas (fímbrias) ou flexíveis (fibrilas), compostas por subunidades protéicas e imunogênicas designados pela letra F (de fímbria), CFA (de colonization antigen factor), CS (de coli surface antigen) ou PCF (de putative colonization factor), sendo essas siglas seguidas de um número (Van den BROECK *et al.*, 2000).

Estes organismos produzem enterotoxinas termo-estáveis e/ou termo-lábeis (ST e LT, respectivamente), que estão entre as toxinas bacterianas melhor caracterizadas. ST-I está associada com doença em humanos e animais e ST-II está associada primariamente, com diarreia em leitões. No entanto, os genes para ST-II (*estB*) estão presentes em algumas amostras de ETEC isoladas de bovinos, galinhas e mesmo em amostras originadas de humanos. LT-I está associada com doenças tanto em humanos quanto em animais enquanto LT-II tem sido encontrada apenas em animais, ainda sem relação com sinais e sintomas de doença (DUBREIL, J.D., 1997).

Enterotoxina termo-lábil do tipo 1 (LT-I): a toxina LT-I é codificada por genes plasmidiais e é uma proteína imunogênica com peso molecular de 100 kDa. Sua estrutura é composta por duas subunidades, A e B. Essa última forma um pentâmero que se liga aos receptores na célula hospedeira (gangliosídios GM1) enquanto a subunidade A central é responsável pelas alterações intracelulares no hospedeiro. LT-I está altamente relacionada com a toxina colérica (CT), apresentando cerca de 80% de identidade nas seqüências das subunidades A e B. LT-I e CT apresentam diversas características em comum, incluindo estrutura da holotoxina, identidade do receptor primário, atividade enzimática e atividade em ensaios animais (GYLES C. L., 1992).

Apesar de algumas infecções por ETEC produtoras de LT-I se assemelharem à cólera em severidade, a maioria das infecções por elas causadas é, em geral, mais branda e de curta duração quando comparadas às infecções ocasionadas pelo *Vibrio cholerae* expressando a toxina colérica. O mecanismo pelo qual ambas causam diarreia está associado à ativação de adenilato ciclase nas células da mucosa intestinal, o que resulta em aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que, por sua vez, aumenta a secreção de ânions e fluídos para o lúmen intestinal (GYLES C. L., 1992).

Um mecanismo alternativo para a diarreia seria a síntese de prostaglandinas da série E (PGE₁ e PGE₂) que atuam estimulando a motilidade intestinal e o transporte de eletrólitos. Um outro mecanismo envolveria a estimulação do Sistema Nervoso Entérico (ENS), que regula a secreção de íons e também a motilidade intestinal. A serotonina e o polipeptídeo vasoativo intestinal, que podem estimular a secreção das células epiteliais intestinais via ENS, são liberados no intestino delgado após tratamento com a toxina colérica. Um terceiro mecanismo potencial envolveria uma leve resposta inflamatória intestinal à presença da LT ou CT, pois sabe-se que CT estimula a produção de interleucina-6, que ativaria o sistema imune entérico e, potencialmente, desencadearia a geração de metabólitos que também poderiam estimular a secreção intestinal (NATARO & KAPER, 1998).

Enterotoxina termo-lábil do tipo 2 (LT-II): a toxina LT-II apresenta muitas características em comum com a LT-I, mas tem sido detectada primariamente em linhagens de *E. coli* isoladas de animais e raramente em linhagens isoladas de humanos. A subunidade A da LT-II apresenta cerca de 55% de identidade com a subunidade A de LT-I e CT, porém a subunidade B não apresenta homologia com a respectiva subunidade das LT-I e CT, o que reflete as especificidades para o receptor celular nos diferentes hospedeiros. Dois membros distintos da família LT-II foram descritos, LT-IIa e LT-IIb, que apresentam 71% e 66% de identidade entre suas subunidades A e B, respectivamente (SEARS & KAPER, 1996).

Da mesma forma que LT-I, a LT-II aumenta os níveis intracelulares de AMPc, porém, diferentemente da LT-I, que se liga ao receptor GM₁, LT-IIa liga-se ao gangliosídeo GD1b, enquanto LT-IIb liga-se ao gangliosídeo GD1a. Ainda não há evidência de associação de LT-II com doenças em humanos e animais (NATARO & KAPER, 1998).

Enterotoxina termo-estável do tipo 1 (ST-I ou ST-a): é um peptídeo de 18 aminoácidos com massa molecular de 2 kDa, não imunogênico, codificado pelo gene *estA* que está associado a um transposon localizado em um plasmídeo. Em ensaios biológicos (teste de Dean) essa toxina causa diarreia em camundongos recém-nascidos (Dean *et al.* 1976). ST-I atua ligando-se a guanilato ciclase, um receptor epitelial presente nas células da bordadura em escova. Estes receptores encontram-se

distribuídos por todo intestino delgado e cólon de humanos, sendo que a presença destes receptores decresce de acordo com o eixo longitudinal do intestino. O tamanho e a natureza do receptor para ST-I tem sido alvo de extensa investigação, resultando na identificação de pelo menos um receptor definitivo, a guanilato ciclase C (GC-C), presente na membrana apical das células epiteliais intestinais. Este receptor seria oportunisticamente utilizado pela ST-I para causar diarreia, uma vez que a guanilina, que é um hormônio de mamíferos, atua como agonista da guanilato ciclase e presume-se que tenha um papel na homeostase do intestino. Após a ligação da ST-I, GC-C é ativada, resultando em aumento dos níveis de GMPc intracelulares que estimulam a secreção de cloreto e a inibição da absorção de NaCl, o que resulta em alta secreção de fluídos (SEARS & KAPER, 1996).

Enterotoxina termo-estável do tipo 2 (ST-II ou ST-b): O gene plasmidial *estB* codifica um peptídeo de 48 aminoácidos. Ainda não se conhece o receptor intestinal para ST-II e nem mesmo o seu domínio tóxico foi caracterizado. Diferente da ST-I, a ST-II não causa diarreia em camundongos recém-nascidos, mas causa acúmulo de fluídos em alça intestinal de porcos pós-desmamados. Além disso, induz danos histológicos no epitélio intestinal causando perda das células das vilosidades e atrofia parcial nos vilos. Seu mecanismo de ação ainda é desconhecido, mas sabe-se que não envolve nucleotídeos cíclicos e, aparentemente, a secreção causada pela ST-II é a do ânion bicarbonato ao invés do cloreto, estimulado pela ST-I (DUBREIL, J.D., 1997).

Há evidências de que ST-II estimule a liberação da prostaglandina PGE₂ e serotonina, sugerindo que o ENS poderia estar envolvido na resposta secretória a esta toxina (NATARO & KAPER, 1998).

As seis categorias de *E. coli* têm sido relacionadas com vários estudos de diarreia e são aceitas como possuidoras de características distintas. Contudo, outros estudos sugerem que pode haver outras categorias de *E. coli* diarreiogênicas bastante distintas das categorias descritas, sendo estas relacionadas com as seguintes toxinas (NATARO & KAPER, 1998):

Toxina Citoletal Distensora (CDT):

Verificou-se que culturas de células epiteliais expostas a sobrenadantes de cultura de *E. coli* eram irreversivelmente bloqueadas no estágio G₂ do ciclo celular, ou seja, antes de entrarem no processo de mitose; neste estágio não proliferativo, as células que não morriam aumentavam de tamanho e adquiriam morfologia de células gigantes mononucleadas. Em linhagens de células CHO (carcinoma de ovário de hamster) e HEp-2, esses sobrenadantes também eram responsáveis pelo rearranjo do citoesqueleto de actina, sendo a toxina encontrada nesses extratos denominada Toxina Citoletal Distensora ou CDT. Nas células epiteliais em cultura, expostas à CDT, a letalidade começa a ser significativa somente após dois dias de incubação, uma característica que claramente diferencia a ação da CDT em relação às Stx, que matam as células pouco tempo após a exposição (De RYCKE & OSWALD, 2001).

Em linfócitos, o efeito de CDT é de certa forma diferente pois não há aumento no tamanho das células, mas se observa que parte das células morre por apoptose. Extratos brutos desta toxina estimulam uma resposta eritematosa em pele de coelho e levam ao aumento de atividade secretora e diarreia em camundongos, após quatro horas de inoculação (OKUDA *et al.*, 1997).

As CDT estão presentes em uma grande variedade de espécies de bactérias Gram-negativas, todas com reconhecido potencial patogênico ao homem e aos animais. Existem quatro diferentes tipos de CDT em *E. coli*: CDT-I, CDT-II, CDT-III e CDT-IV. Em 2004 foi identificada uma nova variante genética de CDT em amostra VTEC O157:H-, denominada então de CDT-V (BIELASZEWSKA *et al.*, 2004).

Os genes que codificam CDT já foram clonados e seqüenciados em várias espécies bacterianas e a expressão da toxina está relacionada com os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. As CDT são compostas por três polipeptídeos, CdtA, CdtB e CdtC (TÓTH *et al.*, 2003).

Também foi demonstrado que CdtB apresenta uma acentuada homologia com DNAses do tipo 1 de mamíferos e que, sozinha, embora apresente toxicidade celular, é insuficiente para interromper por completo o ciclo celular (ELWELL *et al.*, 2001).

Fatores Necrosantes Citotóxicos (CNFs):

Cepas de *E. coli* produtoras dos CNFs têm sido classificadas como NTEC (de *E. coli* Necrotoxigênicas) e têm sido associadas a infecções extraintestinais (septicemia e infecções do trato urinário) e enterites em humanos e animais (BLANCO & BLANCO, 1993). Estas cepas, que são de sorogrupos bastante distintos, produzem duas toxinas associadas, CNF-I e CNF-II, dando origem às denominações NTEC1 e NTEC2, respectivamente. Cepas NTEC1 foram isoladas de humanos, bovinos, suínos, cães, gatos e eqüinos, em casos de diarreia, infecções do trato urinário e septicemia. Já *E. coli* NTEC2 foram isoladas de bovinos e ovinos com diarreia e septicemia (MAINIL *et al.*, 1999). Cepas produtoras de ambos os fatores foram isoladas de fezes normais de seres humanos e animais (BLANCO *et al.*, 1992).

Ainda, NTEC produzem outras toxinas, tais como LT-II, CDT3 ou EAST-I, e possíveis fatores de colonização que podem conferir especificidade de hospedeiro e/ou tecidual. NTEC1 são relacionadas com as adesinas fimbriais das famílias P e S e com as adesinas afimbrias da família Afa. As NTEC1 de origem bovina também podem ser positivas para o CS31A, enquanto linhagens NTEC2 são primariamente positivas para as adesinas fimbriais da família F17 ou para Afa (KAPER *et al.*, 2004).

Apesar dos genes estruturais para estas toxinas serem altamente relacionados, codificando uma proteína de 115 kDa com 86% de similaridade e com 99% dos resíduos de aminoácidos conservados, elas diferem na localização destes genes, na atividade biológica, e são apenas parcialmente relacionadas em ensaios de identidade sorológica. O gene que codifica o CNF-I (*cnf1*) é cromossômico e altamente associado com o gene da hemolisina; o gene para o CNF-II (*cnf2*) está localizado em um plasmídio Vir ou F. Com base nas análises genéticas, ambas as toxinas mostram uma homologia significativa com a toxina de *Pasteurella multocida* que desempenha papel importante na patogênese da rinite progressiva em porcos (SEARS & KAPER, 1996).

Características apresentadas pelos CNF-I e CNF-II são: a habilidade de causar dermonecrose em pele de coelho e multinucleação em diversas linhagens celulares como HeLa (carcinoma de útero humano), HEp-2 e Vero. Contudo, CNF-II é cerca de 100 vezes mais potente que CNF-I em ensaios em pele de coelho e o padrão de alteração morfológica é diferente em células HeLa. Em geral, CNF-II é mais necrótico e

letal que CNF-I em certos ensaios biológicos e, diferente do CNF-I, causa secreção em alça ligada de coelhos após 24 horas (BLANCO & BLANCO, 1993).

O mecanismo molecular de ação destas toxinas é desconhecido. Contudo, tratamento com CNF-I altera o arranjo de F-actina e tubulina nas células eucarióticas, diminui o número de microvilosidades em células epiteliais não intestinais, induz células epiteliais a se tornarem fagocíticas, dessa forma possibilitando a captação de células bacterianas não invasivas. Além disso, o tratamento de células com CNF-I por 24 horas leva a um aumento da expressão de F-actina e a um aumento no volume celular. Tratamento com CNF-II também leva a alterações drásticas na distribuição de F-actina com o desenvolvimento de fibras espessas, observadas por coloração com faloidina. Estas alterações na estrutura do citoesqueleto precedem o desenvolvimento da multinucleação e acredita-se que sejam responsáveis pela subsequente divisão anormal da célula. A atividade específica dos CNF no citoesqueleto é devida à sua capacidade de modificar as proteínas Rho, uma família de pequenas GTPases que regula a fisiologia do citoesqueleto, modulando a montagem de actina nas células eucarióticas. O efeito mais evidente dessa modificação nestas proteínas é a formação de cordões grossos de actina na célula eucariótica. Outra consequência da ativação das Rho é a ativação da síntese de DNA. Os efeitos necróticos e altamente letais exercidos em modelos experimentais mostram que, se liberadas em quantidades suficientes, as toxinas são potencialmente capazes de exercer efeitos toxêmicos sérios (SEARS & KAPER, 1996).

No nível celular, os efeitos exercidos pelos CNFs no citoesqueleto podem ser relevantes para a patogenicidade das linhagens CNF+, primeiro por induzirem essas alterações no citoesqueleto e também pela capacidade dos CNF de induzir a célula eucariótica a ingerir quaisquer partículas em contato com a membrana celular, tais como partículas de látex e/ou bactérias. A aquisição desta capacidade requer exposição aos CNFs por pelo menos 48 horas e isso pode ser interpretado como uma estratégia do patógeno em induzir um prolongado estado de fagocitose nas células epiteliais, permitindo a multiplicação bacteriana e, até mesmo, a transcitose (De RYCKE *et al.*, 1999). Apesar disso o papel dos CNFs na fisiopatologia intestinal ainda é incerto.

FATORES DE COLONIZAÇÃO:

Cerca de 23 anos após a primeira descrição da bactéria *Escherichia coli*, Guynot descobriu, em 1908, que algumas cepas de *E. coli* eram capazes de aglutinar eritrócitos de animais e humanos (hemaglutinação). Em 1955, Collier e De Miranda provaram que essa aglutinação podia ser inibida pela presença de manose e, Duguid e colaboradores demonstraram que as propriedades aglutinantes de *E. coli* estariam correlacionadas à presença de longos apêndices filamentosos, não flagelares, presentes na superfície bacteriana. Eles chamaram essas estruturas de *fímbrias*, enquanto Brinton, em 1959, usou o nome *pili* (Van den BROECK *et al.*, 2000).

A palavra *fímbria* vem do latim e significa “filamento” ou “fibra”. Essas organelas adesivas são algumas vezes também chamadas de *pili*, que vem da palavra latina para “pêlo”. Ambos os termos estão em uso corrente, apesar do termo *fímbria* ser mais comumente usado para as estruturas adesivas, enquanto o termo *pili* usado para se referir ao apêndice usado para a transmissão “sexual” de caracteres (conjugação).

Praticamente todas as espécies de bactérias Gram-negativas apresentam um ou mais tipos de *fímbrias* e mesmo em algumas Gram-positivas já foi comprovada sua presença (Van den BROECK *et al.*, 2000).

Além das *fímbrias*, existem adesinas ditas “amorfas”, chamadas adesinas afimbriais (Afa) ou adesinas não fimbriais (Nfa). Essas adesinas estão presentes na membrana externa da célula bacteriana, como proteínas isoladas, ou como grandes agregados ao redor de toda a célula (MOL & OUDEGA, 1996).

Tomando por base as propriedades de hemaglutinação, as *fímbrias* são classificadas como manose sensíveis (MS) ou manose resistentes (MR). *Fímbrias* MS também são chamadas *fímbrias* comuns ou *Fímbria* do tipo 1. Essas estão, em geral, presentes em linhagens comensais, enterotoxigênicas ou uropatogênicas e têm glicoproteínas ricas em manose como receptor; elas aglutinam uma grande variedade de células animais e são expressas em um amplo espectro de temperatura (18 a 37°C). As *fímbrias* MR, contudo, não são expressas em temperaturas abaixo de 18°C, são consideradas como hospedeiro-específicas e aglutinam ou aderem apenas a um restrito número de células eucarióticas, quando comparadas com a *Fímbria* do tipo 1 (Van den BROECK *et al.*, 2000).

Várias fímbrias MR, isoladas de *E. coli* causadoras de doenças entéricas, foram caracterizadas, tais como os antígenos do fator de colonização I e II – CFA/I e CFA/II de *E. coli* patogênicas para seres humanos, o antígeno K88, que ocorre em algumas variantes sorológicas em linhagens patogênicas para suínos, o K99, encontrado em *E. coli* de origem suína, bovina e ovina; o F41, que em geral apresenta-se associado ao K99, também associado a doenças em suínos, bovinos e ovinos e a fímbria 987P, encontrada em *E. coli* de origem suína. (GYLES, C., 1994).

Em 1983, um novo e simplificado sistema de nomenclatura foi introduzido por Ørskov & Ørskov, no qual as fímbrias eram designadas como antígenos F e apenas esse termo seria usado para essas estruturas. De acordo com esse sistema, as fímbrias do tipo 1, CFA/I, CFA/II, K88, K99 e 987P seriam denominadas F1, F2, F3, F4, F5 e F6 respectivamente; esse sistema visava unificar a nomenclatura das fímbrias à existente para os antígenos sorológicos O, K e H; contudo esse sistema ainda não parece ter sido amplamente adotado (Van den BROECK *et al.*, 2000).

MORFOLOGIA DAS FÍMBRIAS:

A aparência das fímbrias sob microscopia eletrônica tem sido amplamente utilizada para sua classificação. Fímbrias são longos apêndices protéicos que se projetam da superfície bacteriana e que podem alcançar até 2 micrômetros de comprimento, podem variar de 2 a 10 nanômetros de diâmetro estando distribuídas por toda a célula, em número que pode atingir as centenas ou milhares (Van den BROECK *et al.*, 2000).

De maneira geral, dois tipos morfológicos de fímbrias em *E. coli* foram descritos: o primeiro grupo consiste de fímbrias rígidas, cujas subunidades formam uma hélice que tem cerca de 7 nanômetros de diâmetro, com um eixo central oco com aproximadamente 1,5 nanômetro de diâmetro. O segundo grupo consiste de estruturas mais finas e flexíveis com um diâmetro de 2 a 4 nanômetros e, aparentemente, não possuem o tal vazio central. Essa classificação em dois tipos morfológicos distintos pode ser resultado de artifícios na técnica de visualização utilizada, uma vez que estudos indicam que, dependendo das condições de cultivo utilizadas (temperatura, pH e composição do meio de cultura), as fibrilas podem ser visualizadas como estruturas

mais finas ou mais largas e rígidas, demonstrando que essa classificação pode ser bastante “artificial” (MOL & OUDEGA, 1996).

Os FCs descritos para as amostras de ETEC de origem animal são: F4 (K88) (ØRSKOV *et al.*, 1961); F6 (987P) (ISAACSON *et al.*, 1977); F5 (K99) (ØRSKOV *et al.*, 1975); F41 (MORRIS *et al.*, 1978); F17 (LINTERMANS *et al.*, 1988); CS31A (CONTREPOIS *et al.*, 1986); F165 (FAIRBROTHER *et al.*, 1986) e F42 (YANO *et al.*, 1986).

No quadro, a seguir, estão listadas características de fatores de colonização de *Escherichia coli* de origem animal (NAGY & FEKETE, 1999):

QUADRO 1: Características dos FC de *E. coli* de origem animal e associação com sorogrupos:

FC	Tamanho (kDa)	Morfologia	Diâmetro	Manose	Localização	Sorogrupos
F4 (K88)	27,6)	Flexível	2,1 nm	R	Plasmídio	O8, O141, O149
F5 (K99)	16,5	Flexível	5 nm	R	Plasmídio	O8, O20, O101
F6 (987P)	17,2	Rígida	7 nm	NH	Plasmídio	O9, O20
F17 (FY)	20	Rígida	3,4 nm	ND	Cromossomo	O139, O141
F41	29	Flexível	3,2 nm	R	Cromossomo	O101
F42	32	?	?	R	Plasmídio	O8, O9, O11, O18, O32, O35, O98, O101
F165	17,5)	Rígida	4-6 nm	R	Cromossomo	O115
CS31A	29	Flexível	2 nm	NH	Plasmídio	O8, O9, O20, O23, O78, O87, O117, O134, O157, O161

FC: fator de colonização; Tamanho: tamanho da subunidade principal; Manose: sensibilidade à manose: R: manose resistente; S: manose sensível; NH: não hemaglutinante; ND: Não Determinado; ?: Desconhecido.

Dentre os fatores de colonização citados acima e outros relacionados com diversos patotipos de *E.coli*, existem aqueles que apresentam similaridades entre si, tanto na estrutura do operon que as compõem, quanto na cadeia de nucleotídeos, indicando a existência de uma origem comum a vários desses fatores. Esse é o caso

das já citadas fímbrias AAF de EAEC e F1845 de DAEC, que apresentam semelhanças com as adesinas Dr de UPEC, e da família da fímbria F17, que compreende quatro subtipos de fímbrias: F17-a, b, c e d (Le BOUGUÉNEC & BERTIN, 1999). Uma dessas famílias reúne os fatores de colonização F4 (ou K88), F41 e CS31A (GIRARDEAU *et al.*, 1991).

O antígeno F4 (K88) foi primeiramente descrito em 1961 por Ørskov e colaboradores como sendo uma substância termo-lábil (L) cujo desenvolvimento era suprimido a 18°C. Pensava-se que esse antígeno de superfície era capsular (K, de Kapsula) e de natureza polissacarídica. Sendo assim foi batizado como K88 (L), de acordo com os trabalhos anteriores de Kaufmann, em 1947. Stirm *et al.* (1967), isolaram o antígeno K88 aquecendo uma suspensão bacteriana a 60°C por 20 minutos. Assim foi revelada, por análise química das fímbrias purificadas, a natureza protéica do K88, contrastando com a natureza polissacarídica das cápsulas conhecidas até aquele momento (Van den BROECK *et al.*, 2000).

Além disso, exames morfológicos por microscopia eletrônica revelaram que bactérias K88⁺ eram cobertas com material filamentososo e que o antígeno K88 purificado era visto como fibras bastante finas e flexíveis com diâmetro de 2 nm. Todas essas descobertas demonstraram que o K88 não era um antígeno capsular. Porém, essa denominação só foi alterada, e ainda sem unanimidade, em 1983, quando Ørskov & Ørskov propuseram a mudança na nomenclatura para F ao invés de K (Van den BROECK *et al.*, 2000).

Com o uso de antissoros específicos, Ørskov & Ørskov (1964) puderam distinguir duas variantes do antígeno F4, F4ab e F4ac e, em 1979, uma nova variante sorológica, a F4ad. foi descoberta por Guinée e Jansen. Aparentemente, a fímbria F4 contém uma região conservada que forma o determinante 'a' e regiões variáveis que formam os determinantes 'b', 'c' e 'd'.

O grupo de genes para a fímbria F4, localizado em um grande plasmídio não conjugativo, foi clonado e seqüenciado por Shipley *et al.* (1981). Foi extensivamente estudado, sobretudo a variante F4ab e descobriu-se que dez genes, denominados *faeA* até *faeJ* (*fae* de Fimbrial antigen eighty-eight) são responsáveis pelos polipeptídeos

FaeA até FaeJ, e estavam envolvidos na biossíntese da fímbria (Van den BROECK *et al.*, 2000).

Pelo menos nove proteínas, FaeA até FaeI, estão envolvidas na biogênese do F4. A função da proteína FaeJ ainda é incerta. Como a fímbria F4 tem um comprimento de $\pm 1\mu\text{m}$ e um diâmetro de 2,1 nm, é certo que a estrutura montada seja composta por centenas dessas subunidades protéicas, que formam o corpo da fímbria. Análises do grupo de genes do F4 revelaram que a proteína principal da fímbria é codificada pelo gene *faeG* e que a proteína FaeG apresenta um peso molecular calculado em 27,5 kDa (GAASTRA *et al.*, 1981).

Em 1978, Morris *et al.* encontraram um novo fator de colonização, que denominaram F41, na linhagem B41, uma ETEC bovina que também é capaz de expressar o antígeno F5 (K99) (WRAY & WOODWARD. 1997). F41 é uma fibrila de 3,2 nm de diâmetro que confere à bactéria a capacidade de hemaglutinação de eritrócitos de cobaia, humanos e de carneiros na presença de D-manose. Seu determinante genético, localizado no cromossomo bacteriano, foi clonado por Moseley *et al.* (1986) que identificou uma considerável homologia com o F4 (K88).

O fator de colonização CS31A (CS de *coli-surface associated*) foi primeiro descrito na França, em *E. coli* isoladas de casos de diarreia e septicemia em bezerros, Posteriormente também foi encontrado no Canadá, Índia e Japão (CONTREPOIS *et al.*, 1989; SHIMIZU *et al.*, 1987). Em 1991, ESPINASSE *et al.*, relacionaram o CS31A com uma nova síndrome diarreica, na qual ataxia e astenia são os sinais clínicos predominantes, enquanto que a desidratação é raramente observada. Nesses casos, o CS31A aparecia relacionado à Colicina V. Em 1994, JALLAT *et al.* isolaram o CS31A de amostras de *E. coli* isoladas de seres humanos com diarreia. GIRARDEAU *et al.*, (1988), isolaram e purificaram esta adesina a partir de um plasmídio de 105 mDa e, de acordo com estudos de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (EGPA-SDS), verificaram que as subunidades (proteína ClpG) deste FC apresentavam um peso aparente ao redor de 29 kDa. Este FC, a princípio, foi considerado como um tipo de antígeno capsular mas, posteriormente, verificou-se que esta zona capsular estava relacionada à abundância de muitas fibrilas, dispostas sem ordem aparente ao redor da célula. Dessa forma o CS31A claramente difere da estrutura típica apresentada pelas

fímbrias, lembrando mais a estrutura de adesinas presentes em cápsulas e nas adesinas não fimbriais descritas para *E. coli* uropatogênica.

Análise da seqüência de aminoácidos da proteína ClpG na região N-terminal, revelou grande homologia com a proteína FaeG do antígeno F4 (46%) e uma homologia mais distante com a proteína principal do F41, FimF41 (24%), colocando o CS31A como pertencente a esta família de fímbrias. Sua homologia com o F4 se estende até as proteínas acessórias que compõem o operon, muitas das quais são inteiramente homólogas, enquanto que com o F41 essa homologia foi bastante limitada (GIRARDEAU *et al.*, 1991).

Essas homologias entre as proteínas da subunidade principal ficaram ainda mais evidentes quando foi demonstrado que essas proteínas poderiam ser expressa em grandes quantidades, e poderiam ser obtidas fímbrias funcionais quando controladas pelos genes acessórios dos operons dos outros FCs da família. Isso sugere que estas adesinas podem ter se originado de um ancestral comum que, por transferência horizontal de genes, tornou-se adaptado a diferentes receptores no hospedeiro durante a evolução e assim escapando da resposta imune do hospedeiro (KORTH *et al.*, 1994).

Estudos utilizando linhagens de laboratório de *E. coli* (HB101) que expressam o CS31A, revelaram que ele é capaz de promover adesão em culturas de células Int 407 e HL, pertencentes ao epitélio intestinal (KORTH *et al.*, 1991). Entretanto, quando uma amostra de campo isolada de septicemia em bovinos foi testada para verificar sua capacidade de invadir culturas de células de rim canino Madin-Darby (MDKC), sua capacidade de invasão foi semelhante à de uma linhagem mutante que era deficiente para o CS31A, sugerindo que outros fatores poderiam estar associados ao CS31A para que estas amostras possam causar septicemia (KORTH *et al.*, 1994).

ADAMS *et al.*, (1997), encontraram similaridades entre o CS31A e uma nova proteína de 32 kDa expressa por linhagens de *E. coli* enteropatogênicas para coelhos, nas quais o operon responsável pela expressão desta proteína também é bastante similar ao operon *fae* da fímbria F4 e ao operon *clp* do CS31A.

Uma proteína totalmente homóloga ao CS31A - CF29K - foi descrita em *Klebsiella pneumoniae* relacionada a infecções nosocomiais, indicando a possibilidade de transferência lateral entre os genes (DI MARTINO *et al.*, 1995).

Em 1998, BERTIN *et al.*, relatam que o CS31A apresentava adesão ao receptor N-acetilneuramínico presente nas células intestinais humanas Int-407 e encontraram em 56 amostras CNF-I+ uma alta porcentagem de amostras produtoras do CS31A (71% no total) e nas amostras CS31A positivas, muitas delas também eram positivas para EAST-I, demonstrando novas associações entre diversos fatores de virulência.

Baseados nos estudos moleculares de GIRARDEAU *et al.*, (1991) e KORTH *et al.*, (1994), que demonstraram que os operons do F4(K88), F41 e CS31A são muito similares na sua organização e na seqüência de nucleotídeos, e que as proteínas da subunidade estrutural possuem tamanho médio de 27 kDa, apresentando certo grau de homologia, embora menor que as outras proteínas do operon, formulou-se a hipótese de que poderia haver mais um fator de colonização, o qual podia ser enquadrado nessa “família”. Em uma abordagem recente (VALADARES, 2000), onde se procurava avaliar a freqüência de cepas CS31A+ em 255 isolados de *E. coli* provenientes de bezerros diarréicos, observou-se que cepas consideradas CS31A positivas em ensaios de soroaglutinação não apresentaram o mesmo resultado positivo em ensaios de PCR utilizando iniciadores específicos para o CS31A. Esses resultados indicavam tratar-se de um novo fator que apresentava semelhanças antigênicas com o CS31A, uma vez que era reconhecido pelo antissoro anti-CS31A mas que seria suficientemente diferente do CS31A no tocante à seqüência de nucleotídeos do gene da subunidade principal.

Reforçando a teoria de que existem outros fatores de colonização com homologias com F4, CS31A e F41, SCALETSKY *et al.* (2005) relataram a clonagem e a organização de um operon (*lda*, de locus for diffuse adherence) localizado no cromossomo de uma linhagem de EPEC atípica O26:H11, isolada de uma criança com diarreia no Brasil. Segundo os autores, a proteína principal desse operon LdaG apresenta 56% de homologia com a proteína FimF41 (F41), 26% com ClpG (CS31A) e 23% com FaeG (F4) e, de acordo com suas observações em microscopia eletrônica de transmissão, a estrutura das fímbrias desse FC se assemelha à estrutura amorfa das adesinas afimbrias como o Afa de UPEC e Ral de RDEC.

Acreditamos que nestas 41 cepas de *Escherichia coli* que apresentaram identidade antigênica parcial com o CS31A possa existir um fator de colonização ainda desconhecido mas que, provavelmente, pertença à família do CS31A. Deste modo, o

estudo das características deste antígeno de superfície nestas 41 amostras poderá levar à identificação de um novo fator de colonização em amostras de *E.coli* de origem bovina. Importante também seria investigar homologias com os FCs F4, F41 e CS31A, quer na sua seqüência de nucleotídeos, quer na estrutura do operon.

Objetivos

2 - OBJETIVOS:

Este trabalho teve por objetivo caracterizar um provável fator de colonização (PFC) presente em 41 cepas de *Escherichia coli*, isoladas de casos de colibacilose neonatal, que apresenta homologias com genes dos fatores de colonização F4(K88), F41 e CS31A.

Para tanto utilizamos ensaios da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para determinar a localização dos genes do PFC e reações de seqüenciamento dos produtos dessas reações a fim de comparar as seqüências obtidas com aquelas dos FCs F4, F41 e CS31A.

O gene responsável pela proteína principal do PFC foi clonado e a proteína foi expressa e purificada, visando obtenção de antissoro monoespecífico. Além disso, determinamos a estrutura secundária da proteína principal do PFC utilizando ferramentas de bioinformática.

Também verificamos a morfologia do PFC em ensaios de microscopia eletrônica e avaliamos a habilidade das cepas portadoras do PFC em aderir e/ou invadir culturas de células: Caco-2 (carcinoma de cólon humano), HeLa (carcinoma epitelial de cérvix humana), HEP-2 (carcinoma de laringe humana) e HT-29 (carcinoma de cólon humano)..

Material e Métodos

3 - MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 - CEPAS BACTERIANAS:

3.1.1 - LINHAGENS PADRÃO:

Foram utilizadas linhagens de *Escherichia coli* produtoras dos fatores de virulência abaixo descritos, todas pertencentes à Bacterioteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia - IB - UNICAMP:

LINHAGEM	CARACTERÍSTICAS
B41M - O101:K-:F41+	produtora do fator de colonização (FC) F41
31A	produtora do FC CS31A e do FC F17-c
190-1 - (K12 K88ab+)	produtora do FC F4ab (K88ab)
1476 - (K12 K88ac+)	produtora do FC F4ac (K88ac)
H56 - (K88ad+)	produtora do FC F4ad (K88ad)
DH5α	controle negativo
Linhagens de <i>E. coli</i> utilizadas nos ensaios de adesão celular:	
O431-1 - O64:H4	Padrão para Aderência Agregativa
C1845 - O75:H-	Padrão para Aderência Difusa
E 2348/69 - O127:H6	Padrão para Aderência Localizada
Linhagens adquiridas da Invitrogen Inc, EUA:	
One Shot TOP 10	Para clonagem dos produtos de PCR no vetor pET-151 TOPO F- <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> M15. <i>lacX74 recA1</i> <i>deoR araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
BL21 Star(DE3)	Para expressão do vetor pET-151 TOPO F- <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B-m_B-</i>) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)
BL21 Star(DE3) PFC ⁺	Linhagem receptora do vetor pET-151 TOPO que contém o gene da subunidade principal do fator de colonização em estudo

3.1.2 – CEPAS DE CAMPO:

Foram utilizadas 41 cepas de *E. coli*, isoladas de 33 bezerros com diarreia, com idades de até 60 dias. Essas cepas foram selecionadas como portadoras de um possível novo fator de colonização (VALADARES, 2000), por apresentarem identidade antigênica parcial com o FC CS31A.

No Quadro 1 estão discriminados os nomes originais das cepas envolvidas neste estudo, os fatores de virulência presentes e o sorotipo de cada uma delas.

No referido trabalho, tínhamos realizado previamente os ensaios para determinação dos antígenos somáticos “O” e flagelares “H” e também ensaios de PCR para determinação de outros fatores de virulência associados a estas cepas, a saber:

- Fatores de colonização:

Fímbria do Tipo 1 (F1)

F5(K99);

F17;

F41;

F165 e

Intimina (gene *eae* - enterocyte adherence factor).

- Toxinas:

Enterotoxina termo-estável do tipo 1 (ST-I) e do tipo 2 (ST-II);

Enterotoxina termo-estável do tipo 1 de *E. coli* enteroagregativa (EAST-I);

Enterotoxina termo-lábil do tipo 2 (LT-II);

Toxinas “tipo - Shiga” do tipo 1 e 2 (Stx-I e Stx-II) e

Fator Necrosante Citotóxico do tipo 1 e 2 (CNF-I e II).

QUADRO 02: SOROTIPOS E FATORES DE VIRULÊNCIA DE CEPAS DE *E. coli*

BEZERRO	CEPA ORIGINAL	SOROTIPO	FATORES DE VIRULÊNCIA									
			Fatores de Colonização				Toxinas					
			F5	F17	F41	F165	ST-I	ST-II	EAST-I	CNF-I	Stx-I	Stx-II
1	50(3)	O7:H6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	57(B-1)	O26:H11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	88(6)	O27:H21	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	94(2)	O3:H16	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	111(2)	R:NT	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
6	306(C-2)	O3:H16	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
7	416(C-1)	O3:H16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	417(C2-2)	R:NM	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
9	1162(D-5)	O8:H21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	1162(D-7)	NT:NM	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	1162(D10)	O11:NM	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
10	2147(4)	O8:NT	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
11	3106(C-4)	NT:H8	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
12	E57(14) 26	O8:H7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	E57(15) 10	R:NM	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
14	E57(19) 13	R:H8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	E57(25)05	O27:H21	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
16	E57(40)19	O64:H48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	E57(43)22	O64:H48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	E57(48)29	O7:H8	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
19	E57(49)09	O33:H25	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
20	E57(50)21	O2:H42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
21	E57(55)33	O146:H21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
22	A 8236	O8:H7	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	B 8236	O153:H8	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
23	FRC A AM1	O8:H19	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
24	FRC B AM1	O153:H8	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
25	COX B AM 4	O153:H8	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
26	CNPGC A	O153:H8	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
27	CG 1898-A	O6:H21	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
28	CG 1902-B	O117:H10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	CG 1902-C	NT:NT	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
	CG 1902-D	O25:NT	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
29	CG 1905-B	O25:NT	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
30	CNPGC 577(2)	NT:H7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	CNPGC 577(4)	O2:NM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	CNPGC 1117(2)	R:NM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	CNPGC 2147(2)	R:NM	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CNPGC 2147(4)	O2:H32	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
33	CNPGC 2279(1)	O138:NM	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	CNPGC 2279(3)	O138:NM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: R – Rugosa; NT - Não tipável; NM – Não móvel.

3.2 - DESENHO DE INICIADORES PARA OS GENES ADJACENTES AO GENE PRINCIPAL DO PFC:

Para verificar a hipótese de o PFC fazer parte da família do FC F4, F41 e CS31A de *E. coli*, nos baseamos nos estudos de GIRARDEAU *et al.* (1991) e KORTH *et al.* (1991) para investigar a possibilidade de usar reações de PCR para amplificar o gene responsável pela subunidade principal do fator de colonização em estudo.

Consultamos a base de dados do GENBANK, onde se encontram disponíveis as seqüências de genes de diferentes organismos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). Infelizmente o único operon dessa família, que se encontra perfeitamente seqüenciado e do qual se conhece as distâncias entre os genes que o compõem é o operon *fae* (do F4). Do operon *clp* do CS31A estão disponíveis apenas as seqüências dos genes que o compõe, mas não estão descritas as distâncias entre os genes dentro do operon. Em relação ao operon *fimf41* que codifica o F41, apenas a seqüência do gene da subunidade principal encontra-se disponível (*fimF41a*).

Em nossos estudos comparativos utilizamos como modelo e como parâmetro para as distâncias entre os genes, o operon *fae* (FIGURAS 1 e 2) e comparamos a seqüência dos genes adjacentes ao gene da subunidade principal nos operons *fae* e *clp*. Assim foram comparados os genes *faeF* (acesso Genbank nº Z11699) e *clpF* (acesso Genbank nº M96174) à montante dos genes *faeG* (acesso Genbank nº Z11700) e *clpG* (acesso Genbank nº M55389) e os genes *faeH* (acesso Genbank nº Z11700) e *clpH* (acesso Genbank nº M96152) à jusante dos genes *faeG* e *clpG*, respectivamente, como mostram as FIGURAS 1 e 2. Convém salientar que os genes *faeF* e *clpF* apresentam uma extensa homologia (cerca de 84,79%). O mesmo pode ser aplicado aos genes *faeH* e *clpH* que apresentam homologia de 87,8%.

Os iniciadores foram selecionados pelo programa Primer Design (www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi) utilizando a metodologia que leva em conta as relações termodinâmicas entre cada nucleotídeo que compõe o iniciador (BORER *et al.*, 1974), para que apresentassem a mesma temperatura de anelamento, ou seja, ao redor de 58°C.

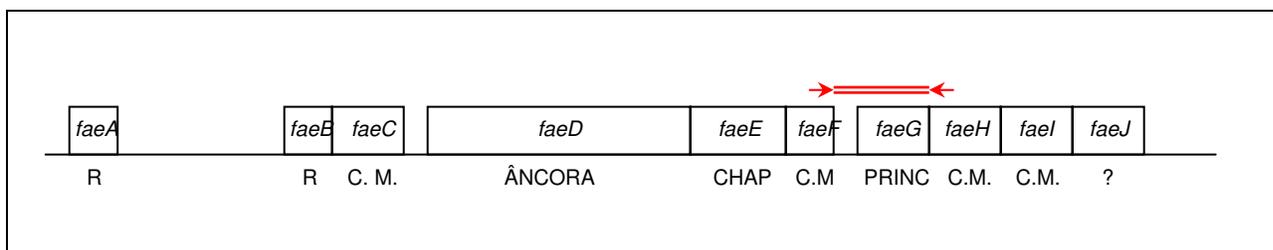


FIGURA 1: Estrutura do operon *fae* do fator de colonização *F4* de *E. coli*; os nomes dos genes estão indicados em itálico dentro dos boxes, as setas indicam a região a ser amplificada. Legenda: R: genes regulatórios (*faeA* e *faeB*); C.M.: Componente Menor da estrutura fimbrial (*faeC*, *faeF*, *faeH* e *faeI*); ÂNCORA: proteína de ancoragem na membrana externa (*faeD*); CHAP: proteína de transporte periplasmático – chaperona – (*faeE*); PRINC: componente principal da fímbria (*faeG*); ?: gene com função desconhecida (*faeJ*). Modificado de VAN den BROECK *et al.*, 2000.

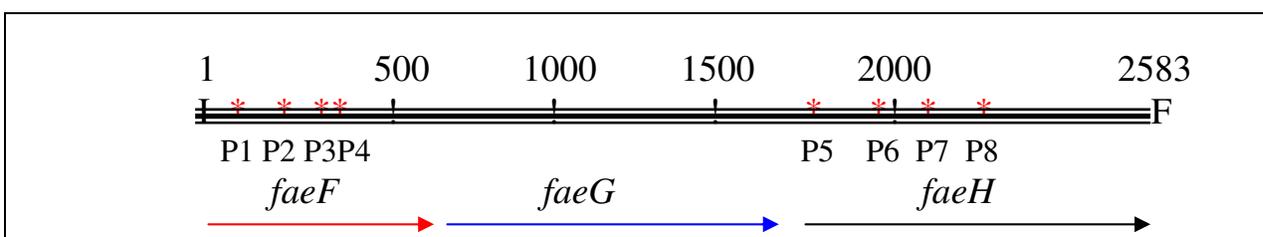


FIGURA 2: Modelo da região onde foram alinhados os iniciadores (com base no operon *fae* de *E. coli*). LEGENDA: P1 a P8: iniciadores; I: início e F: final da sequência no modelo apresentado. Números de 1 a 2583: pares de base no modelo

3.3 – PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DA REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR) PARA DETECÇÃO DOS GENES RESPONSÁVEIS PELA SUBUNIDADE PRINCIPAL DO PFC:

Foram realizados ensaios de PCR visando a padronização das reações com o uso dos iniciadores selecionados para amplificar o gene da subunidade principal do PFC.

3.3.1 – OBTENÇÃO DO DNA BACTERIANO:

O método de Van SOOLINGEN *et al.* (1993) para obtenção do DNA bacteriano foi por nós empregado, com segue:

As cepas bacterianas foram cultivadas em tubos com 4 mL de infusão de cérebro e coração (BHI - Difco) a 37°C por 18 horas; após isso as células foram centrifugadas a 12.000 x g por 2 minutos, sendo posteriormente descartado o sobrenadante.

Ao sedimento foram adicionados 500µL de tampão T.E. (Tris-EDTA pH 8,0 – Merck) para lavagem das células e, estas foram novamente suspensas em 400µL deste tampão. A esta suspensão foram adicionados 40µL de lizozima (Calbiochem), na concentração de 10mg/mL e 10µL de RNase (Promega) na concentração de 10mg/mL. Em seguida a mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C por 18 horas.

Após este período foram adicionados 75µL de uma solução SDS (Sigma) 10% e 70µL de Proteinase K (Calbiochem) também na concentração de 10mg/mL e a suspensão foi novamente homogeneizada e incubada a 65°C por 10 minutos. Acrescentou-se 100µL de NaCl 5M e 100 µL de solução CTAB (Hexadecyltrimethyl ammonium bromide- Sigma)/NaCl (Nuclear). A mistura foi agitada com “vortex” até que o líquido tomasse um aspecto leitoso sendo incubada a 65°C por mais 10 minutos. Depois desse período foram adicionados 750µL de clorofórmio(Merck)/álcool isoamílico (Reagen) na proporção 24:1 e a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos.

O sobrenadante (1ª fase aquosa) foi transferido para um outro tubo e a ele foram adicionados 450 µL de isopropanol (Merck) e a mistura foi resfriada a -20°C por 30 minutos.

Após esta etapa a solução foi novamente centrifugada, o sobrenadante descartado e ao sedimento adicionou-se 1 mL de etanol a 70%. A suspensão foi resfriada novamente a -20°C por 30 minutos e posteriormente centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos, sendo o precipitado foi incubado em estufa a 37°C até que o etanol residual se evaporasse. Após, o sedimento foi suspenso em 100µL de tampão T.E. (pH 8,0) e estocado a -20°C.

3.3.2 – ENSAIOS DE PCR:

Para as reações de amplificação utilizamos o protocolo de BLANCO *et al.* (1997), com modificações (INNIS *et al.*, 1990). Assim, para um volume final de reação de 50µL foram utilizados:

5µl de tampão de reação (Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 25 mM) 10x concentrado (Fermentas);

3µl de MgCl₂ – Fermentas - a 1,5 mM;

1µl de dNTPs – Fermentas - a 10mM;

1µl de cada um dos iniciadores (300 ng de cada);

2µl do DNA extraído (DNA total em concentração de 100 ng/µL);

1 Unidade da Enzima *Pfu* DNA polymerase 0,5 U/ µl (Promega);

água deionizada esterilizada (q.s.p. 50 µl).

Após uma etapa inicial de aquecimento a 94°C por 5 minutos, as amostras foram amplificadas por 30 ciclos (em Máquina MasterCycle Gradient – Eppendorf) descritos a seguir:

1 minuto a 94°C (Fase de Desnaturação);

1 minuto na temperatura ideal de cada “iniciador” (Fase de Anelamento);

12 reações diferentes, com um gradiente de 50°C a 70°C com as seguintes temperaturas (selecionadas automaticamente pelo equipamento): 50°C; 50,3°C; 51,4°C; 53,2°C; 55,5°C; 58,1°C; 60,8°C; 63,5°C; 65,0°C; 67,6°C, 68,9°C e 70,5°C.

2 minutos a 72°C (Fase de Extensão).

7 minutos a 72°C (Fase de Extensão Final).

3.4. - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE:

Após as reações de amplificação, uma alíquota de 10µL da reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, sob voltagem de 100 V até que o indicador Xileno Cianol (Sigma) tivesse percorrido 2/3 do gel. As bandas de DNA foram coradas com solução de brometo de etídio (0,01 mg/mL) e visualizadas em transluminador de luz ultravioleta. Em cada gel foi incluído um padrão de peso molecular conforme o uso: 100 bp DNA ladder e 1 kb DNA ladder (Promega).

3.5 – REAÇÕES DE SEQÜENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR:

Os produtos obtidos nos ensaios já padronizados de PCR foram purificados em coluna Qiaquick (Qiagen) e seqüenciados pelo método de dideoxynucleotídeos terminadores utilizando-se o kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Perkin Elmer), conforme as instruções do fabricante. Os produtos purificados também foram analisados em seqüenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems), segundo metodologia adotada pelo Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), sendo as seqüências determinadas a partir dos eletroferogramas resultantes das reações.

3.6 – ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS OBTIDAS COM AS SEQÜÊNCIAS DESCRITAS PARA DIFERENTES FATORES DE COLONIZAÇÃO DE *Escherichia coli* DE ORIGEM ANIMAL:

3.6.1 – ALINHAMENTO COM OS GENES DA SUBUNIDADE PRINCIPAL DO F4, F41 E CS31A:

Com as seqüências obtidas na etapa anterior, procuramos verificar eventuais homologias com outros fatores de colonização presentes em *E.coli*, sobretudo com os fatores de colonização F4, F41 e CS31A.

Realizamos alinhamentos utilizando o programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), comparando as seqüências obtidas com as dos genes dos fatores de colonização, a saber:

Genes *faeF*, *faeG* e *faeH*, que codificam a subunidade principal (gene G) e subunidades menores (genes E e H) do F4;

Genes *clpF*, *clpG* e *clpH*, que codificam a subunidade principal (gene G) e subunidades menores (genes E e H) do CS31A;

Gene *fimF41*, que codifica a subunidade principal do F41 (acesso Genbank nº M21788).

Gene *fimA* – que codifica a subunidade principal da Fímbria do Tipo 1 (acesso GenBank nº AF286465).

3.6.2 – DETERMINAÇÃO DAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE AS PROTEÍNAS DAS SUBUNIDADES PRINCIPAIS DOS FC: F4, F41, CS31A E PFC:

Utilizando as seqüências de nucleotídeos obtidas anteriormente, e visando determinar a provável composição de aminoácidos da proteína que compõe a subunidade principal do PFC, utilizamos o software BioEdit v 5.0.6 (HALL, 1999) para traduzir a seqüência completa de aminoácidos, desde o primeiro códon iniciador das proteínas (ATG) até o códon de terminação (TAA). As características bioquímicas da proteína PFC (número e composição de aminoácidos, peso molecular e ponto isoelétrico) foram determinadas utilizando o programa PROTPARAM (<http://au.expasy.org/cgi-bin/protparam>).

Essa cadeia de aminoácidos foi utilizada para comparação com as cadeias de aminoácidos das proteínas codificantes da subunidade principal dos fatores de colonização descritos a seguir:

Proteína FaeG – subunidade principal do F4 - acesso GenBank n° Z11700;

**MKKTLLIALAIAASAASGMAHAWMTGDFNGSVDIGGSITADDYRQKWEWKVGTGLNGFGNVLNDLT
NGGTKLTITVTGNKPILLGRTKEAFATPVTGGVDGIPHIAFTDYEGASVVLNRPDGETNKKGLAYFVL
PMKNAEGTKVGSVKVNASYAGVLRGGVTSADGELLSLFADGLSSIFYGGLPRGSELSAGSAAAART
KLFGLSRNDILGQIQRVNANITSLVDVAGSYRENMEYTDGTVVSAAYALGIANGQTIEATFNQAVTTS
TQWSAPLNVAITYY**

Proteína ClpG – subunidade principal do CS31A - acesso GenBank n° M55389;

**MKKTLLIALAVAVSAVSGAAHAWTTGDFNGSFDMNGTITADAYKDKWEWMVGGALSFNNTIKEMTG
DSKLLTITQSEPAIILLGRTKEAFAASIVGVGAIPLIAFSYEGKGVVALQSSGDNGKGFELPMKDDSG
NNGSVKVNVTSAAGLFSYSEISTGLVGITSVASGDNTSIYYGGLVSPAIRAGKDAASAVSKFGNYNHTQ
LLGQLQAVNPAGNRGQVNKNSAVSQNMVMTTGDVIASSYALGIDQGQTIEATFTNPVVSTTQWSAP
LNVAVTYN**

Proteína FimF41 – subunidade principal do F41 - acesso GenBank n° M21788;

**MKKTLLIALAVAASAAVSGSVMAADWTEGQPGDIIGGEITSPSVKWLWKTGEGLSSESNTTNEIVKRK
LNISVPTDELFLAAKMSDGIKGVFVGNLIPKIEMASYDGSVITPSFTSNTAMDIKVKNSGDNTELG
TSLVPLSFGAAVATIFDGNTTDSAVAHITSGSAGTVFEGLVNPGRFTDQNIAYKWNGLSKAEMAGYVE
KLMPGKSASTSYSGFHNWDDLSPNYTSADKASYLSYSGSVSAGSTLVMNLNKDVAGRLEWVAPVTI
TVIYS**

Proteína FimA – subunidade principal da Fímbria do Tipo 1 - acesso GenBank n° AF286465;

**MKIKTLAIVVLSALSLSSTAALADTTPTTVNGGTVHFKEVVNAACAVDAGSVDQTVQLGQVRTATL
KQAGATSSAVGFNIQLNDCDTTVATKAAVAFLGTAIDSTHPKVLALQSSAAGSATNVGVQILDRTGNE
LTLDGATFSAETTLNNGTNTIPFQARYFATGAATPGAANADATFKVQYQ**

A utilização das proteínas FaeG, ClpG e FimF41 visa a comparação da seqüência do PFC com outros FC, segundo nossa hipótese, da mesma família; a seqüência da Fímbria do 1 foi utilizada como grupo externo, um parâmetro para inferir parentesco entre os outros fatores de colonização em estudo.

As seqüências de aminoácidos foram comparadas com as seqüências disponíveis no GenBank. Utilizando-se o programa CLUSTALW (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/clustalw.html>) foram obtidos alinhamentos múltiplos. A partir destes foram preparadas árvores filogenéticas utilizando-se o programa Mega (www.megasoftware.net), observando o método de *neighbour-joining* com correção Poisson. Os ramos das árvores foram testados por *bootstrap*, com 2.000 repetições (THOMPSON *et al.*,1994).

3.7 – ENSAIOS DE PCR PARA CLONAGEM DO GENE RESPONSÁVEL PELA SUBUNIDADE PRINCIPAL DO PFC:

Visando obter o gene completo do PFC, foram realizados ensaios de PCR para que pudessem ser iniciados os experimentos de clonagem e superexpressão desse gene na linhagem de *E.coli* modificada geneticamente [BL21 Star (DE3)].

3.7.1 – OBTENÇÃO DO DNA BACTERIANO:

Nestes estudos foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 3.3.1.

3.7.2 – ENSAIOS DE PCR:

Para amplificar o gene do PFC, desenhamos os iniciadores (Invitrogen) descritos na FIGURA 3, desenhados especialmente para anelar exatamente nas porções inicial e final do gene do PFC, permitindo seu posterior encaixe no vetor de expressão a ser inserido nas linhagens TOP10 e BL21, de acordo com as instruções do fabricante do vetor.

<p>TOPO A: 5'-CAC CAT GAA AAA GAC TTT GAT TGC-3' (ANELA NA FITA COMPLEMENTAR)</p> <p>TOPO B: 5'-TTA GTT ATA AGT AAC TGC TAC GTT-3' (ANELA NA FITA CODANTE)</p>
--

FIGURA 3: Sequências dos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR para fins de clonagem do gene para subunidade principal do PFC.

Esses iniciadores foram desenhados para que apresentassem temperatura de anelamento ao redor de 58°C, utilizando a metodologia descrita no item 3.2.

Para a realização das reações de amplificação, utilizamos o mesmo protocolo descrito no item 3.3.2. Os produtos de reação foram purificados utilizando-se coluna Qiaquick (Qiagen).

3.8 – ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DO GENE PARA A SUBUNIDADE PRINCIPAL DO PFC NO GENOMA DAS CEPAS DE *E. coli* ENVOLVIDAS NO ESTUDO:

Para conhecer a localização dos genes que compõem o operon do PFC, fizemos um experimento de extração de DNA plasmidial, seguido de reações de PCR nas 41 cepas envolvidas no estudo.

As extrações de DNA plasmidial foram realizadas utilizando-se o kit Wizard SV Minipreps (Promega). Para efeito de comparação, utilizamos DNA genômico e a mesma metodologia descrita no item 3.3.1 (Van SOOLINGEN *et al.*, 1993), os iniciadores descritos no item 3.2 e a metodologia de PCR descrita no item 3.3.2.

3.9 - TRANSFORMAÇÃO E CLONAGEM DOS PRODUTOS DE PCR:

Para a expressão do gene que codifica a subunidade principal do PFC, inserimos o gene em um vetor de expressão. Adotamos o Kit Champion pET 151 TOPO (Invitrogen) de clonagem direcional e transformação das linhagens de laboratório *E. coli* TOP10 e *E. coli* BL21 Star (DE3). Os experimentos para obtenção e manipulação de microrganismos geneticamente modificados foram devidamente submetidos à aprovação da Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Biologia da Unicamp e recebeu o protocolo nº 2003/003 (ANEXO A).

3.9.1 - REAÇÃO DE LIGAÇÃO VETOR-INSERTO:

Todo o procedimento seguiu as recomendações do fabricante do kit. Após a amplificação por PCR, 5 a 10 nanogramas da reação (0,5 até 4 μ L) foram adicionados a 1 μ L da solução de sais, 1 μ L do vetor TOPO e água estéril q.s.p. 5 μ L. Essa mistura foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, a reação foi incubada em banho de gelo ou colocada a -20°C por 18 horas, até que fossem realizados os experimentos de transformação.

3.9.2 - EXPERIMENTOS DE TRANSFORMAÇÃO DAS *E. Coli* TOP10:

Uma alíquota de 3 μ L da reação de ligação foi adicionada ao frasco contendo as células TOP10 quimicamente competentes, que foi então gentilmente misturada. Incubou-se em banho de gelo por 30 minutos e depois as células sofreram um choque térmico por 30 segundos a 42°C sem agitação. Após, o frasco retornou novamente para o banho de gelo e foram adicionados 250 μ L do meio S. O. C. pH 7,0 [Tryptona (Difco)– 2,0g; Extrato de Levedura (Difco) – 0,5g; NaCl (Nuclear) – 0,05g; 1mL de KCl (Nuclear) 250 mM; 1mL de MgCl₂(Merck) 1M; 2 mL de glicose (Nuclear) a 20% p/v, H₂O deionizada q.s.p. 100 mL]. Posteriormente o tubo foi incubado sob agitação a 37°C por 30 minutos.

Semeamos 100 a 200 μ L da suspensão em placas de ágar L.B. [Luria-Bertani: Tripton (Difco)- 0,5g; Extrato de levedura (Difco) – 1g; NaCl (Nuclear) – 0,5g; ágar bacteriológico (Oxoid)– 1.5g; H₂O deionizada q.s.p. 100mL), acrescido de 100 μ g/mL de carbenicilina (Sigma) para seleção dos transformantes e as placas foram incubadas a 37°C por 18 horas.

3.9.3 - SELEÇÃO DOS CLONES POSITIVOS:

Da placa de Petri, selecionamos cinco colônias que foram inoculadas em tubos contendo caldo LB, acrescido de carbenicilina. Os tubos foram cultivados a 37°C por 18 horas. Posteriormente extraímos os plasmídios utilizando o Kit Wizard SV Minipreps (Promega).

3.9.4 - EXPERIMENTOS DE TRANSFORMAÇÃO DAS *E.coli* BL21 Star(DE3):

O procedimento de transformação foi semelhante ao descrito anteriormente: 5 a 10 ng de DNA plasmidial foram adicionados ao tubo contendo as células BL21 Star (DE3), que foi incubado em banho de gelo, sofreu choque térmico, recebeu 250µL de meio S.O.C. e foi incubado sob agitação a 37°C por 30 minutos. O conteúdo do frasco foi adicionado a um tubo contendo 10mL de caldo L.B. contendo carbenicilina (100µg/mL) e 1% p/v de glicose. Este foi incubado por 18 horas a 37°C e a seleção dos clones foi realizada como descrito no item 3.9.3

3.10 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PFC:

Para a expressão da proteína do PFC, as colônias das *E. coli* BL21Star (DE3) transformadas anteriormente obtidas foram semeadas em tubos contendo 10mL de caldo LB com carbenicilina (100 µg/mL) e 1% de glicose. Os frascos foram incubados sob agitação a 37°C por 18 horas. Após esse período, o cultivo foi transferido para erlenmeyer contendo 490mL de LB (com carbenicilina 100µg/mL e 1% de glicose) e incubados por 2 horas a 37°C com agitação, até que as bactérias estivessem em fase exponencial de crescimento, nesta etapa foi acrescentado ao cultivo IPTG (isopropilthio-β-galactosideo - USB), em uma concentração final de 1mM, para que houvesse a indução da expressão da proteína. Após 6 horas de incubação a 37°C, o cultivo foi centrifugado por 5 minutos a 10.000 x *g*, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano congelado a -20°C até ser usado.

3.11 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DO PFC:

Para a purificação da proteína PFC, as bactérias obtidas na etapa anterior foram processadas da seguinte forma:

Após descongelamento, o sedimento foi ressuspenso em 20 mL de tampão de lise (50mM Tris-HCl pH7,8; 300mM NaCl, liozima - 0,2mg/mL) contendo os inibidores de protease: PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride - Sigma) - 1mM, leupeptina (Sigma) - 1µg/mL e pepstaina A (Sigma) – 1 µg/mL. Em seguida, a suspensão foi sonicada (Sonic Dismembrator – Fisher Scinetific) em gelo por quatro ciclos de 35 kHz com pulsos de

300 ms/s por 10 segundos cada, sendo posteriormente centrifugada a $10.000 \times g$ a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e congelado a -20°C .

3.11.1 – PURIFICAÇÃO EM COLUNA DE AFINIDADE:

Visando a separação seletiva da proteína recombinante (proteína PFC + cauda de Histidina), o sobrenadante obtido na etapa anterior foi cromatografado em sistema FPLC Äkta (Amersham) utilizando coluna de afinidade Ni-NTA (6xHis) com íon metálico, (níquel) imobilizado – IMAC chromatography – 10 mL (Qiagen), segundo as metodologias descritas pelo fabricante. A coluna foi equilibrada com o tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5. Um volume igual a 5 mL foi aplicado, eluído inicialmente com Tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 e, posteriormente, em gradiente linear de 0 a 0,3M de imidazol no mesmo tampão, com fluxo de 1mL/min. Frações de 2mL/tubo foram coletadas e aquelas que apresentaram pico de absorvância em luz ultravioleta a 280 nm foram armazenadas a -20°C .

3.12 – DIÁLISE DAS FRAÇÕES E DOSAGEM DE PROTEÍNAS:

As frações cromatográficas de interesse foram dialisadas exaustivamente contra salina tamponada com fosfato (PBS) 0,15 M, pH 7,4, após o que foram concentradas por ultrafiltração em tubos Microcon (Millipore) e a concentração de proteína existente nas frações foi determinada através de leitura em espectrofotômetro Beckman DU-65, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

Para a dosagem de proteínas foi utilizado o método de Lowry modificado por HARTREE, E.F., (1972) sendo as frações posteriormente congeladas.

3.13 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ELETROFORESE:

Alíquotas de $10\mu\text{L}$ das frações obtidas na etapa anterior foram descongeladas e misturadas a igual volume de tampão de amostra para EGPA-SDS 2x concentrado [0,5M de Tris-HCl pH 6,8; 2% de SDS (dodecil sulfato de sódio), 10% de glicerol, 2% de β -mercaptoetanol e 0,5% de azul de bromofenol]; essa mistura foi aquecida em banho-

maria fervente por 5 minutos, sendo em seguida brevemente centrifugada e foi então reservada para os ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA-SDS).

3.14 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS (EGPA-SDS):

A EGPA-SDS foi realizada no sistema descontínuo dissociante de LAEMMELI, U. K., (1970). A montagem dos géis e as condições de corrida seguiram a metodologia descrita no "*Hoefler Electrophoresis Catalog and Exercises*", (1991).

Cinco microlitros das diferentes fases da purificação em escala piloto foram aplicados nas canaletas do gel e a corrida eletroforética consistiu na aplicação de uma corrente elétrica com intensidade de 30 mA (cerca de 100 volts) por aproximadamente 1 hora ou até que o indicador azul de bromofenol (Sigma) atingisse o final do gel de separação. Como padrão de peso molecular utilizamos os marcadores presentes no "kit" #SM0431 Protein Molecular Weight Marker (Fermentas) com os padrões: β -galactosidade (116,0 kDa); albumina de soro bovino (66,2 kDa); ovalbumina (45,0 kDa); lactato desidrogenase (35,0 kDa); endonuclease *Bsp98I* (25,0 kDa); β -lactoglobulina (18,4 kDa); lisozima (14,4 kDa).

3.15 – FIXAÇÃO E COLORAÇÃO DOS GÉIS

As bandas protéicas presentes nos géis foram visualizadas por coloração com prata como descrito por OAKLEY *et al.* (1980). O gel foi fixado por 18 horas em solução contendo 50% (v/v) de metanol e então lavado com água destilada por duas vezes. A última solução de lavagem continha ditioneitol – DTT - (5 mg/litro), para um padrão mais reprodutível de fixação. Após isso o gel foi imerso por 15 minutos em solução de prata amoniacal e lavado por duas vezes em água destilada por 2 e 5 minutos. Após revelação o gel foi lavado por 1 hora em água destilada com três trocas de água e, a seguir, foi fotografado.

3.16 – OBTENÇÃO DE ANTISSORO MONOESPECÍFICO:

Antes da realização desse experimento, o protocolo descrito a seguir foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp sob o protocolo nº 719-1 (ANEXO B).

O antissoro foi obtido utilizando-se como imunógeno a proteína PFC purificada, de acordo com descrição de Guiné *et al.* (1980). A concentração de proteína foi ajustada para 50µg/mL e esta foi emulsionada com adjuvante completo de Freund e inoculada por via intradérmica em coelhos machos, da raça Nova Zelândia, albinos e com 2 meses de idade. Trinta dias após a primeira inoculação, uma segunda dose, preparada com adjuvante incompleto de Freund foi administrada a esses coelhos. Dez dias após a segunda inoculação foi realizada sangria de prova e verificados os títulos de anticorpos, os coelhos foram sangrados a branco; os soros foram então aliquotados e estocados a -20°C.

3.16.1 – ABSORÇÃO DOS ANTISSOROS:

A cepa de *Escherichia coli* de campo CG1905-B foi cultivada em placas de ágar Minca [KH₂PO₄, 1,36 g; Na₂HPO₄.2H₂O, 10,1g; glicose, 1 g; solução de sais (MgSO₄.7H₂O, 10 g; MnCl₂.4H₂O, 1 g; FeCl₃.6H₂O, 0,135 g; CaCl₂.2H₂O, 0,4 g em 1 litro), 1 mL; Casaminoácidos (Difco), 1 g; ágar, 12 g; água deionizada q.s.p. 1,000 mL. pH 7,5], que foram incubadas a 16°C por 48 horas. O crescimento bacteriano foi ressuspenso com salina fisiológica formalinizada (0,5%). Observou-se a inocuidade dessa suspensão. Os antissoros anti-PFC foram diluídos 1:5 com salina fisiológica sendo então absorvido três vezes (v/v) com a suspensão bacteriana formalinizada. A absorção consistiu na incubação do soro diluído, juntamente com a suspensão bacteriana, por 1 hora a 37°C, seguida de incubação por duas horas em refrigerador. Ao final deste período, a suspensão foi centrifugada e ao sobrenadante nova quantidade da suspensão bacteriana foi adicionada, repetindo-se o processo. Os títulos dos anticorpos foram novamente determinados por aglutinação em lâmina, frente à amostra CG1905-B cultivada a 37°C.

3.17 - WESTERN BLOTTING:

A transferência de proteínas dos géis de poliacrilamida para suportes de nitrocelulose seguiu a metodologia descrita por TOWBIN *et al.* (1979).

A EGPA-SDS foi realizada como descrito no item 3.13 após o que o gel foi colocado sobre papel de nitrocelulose (Amersham) previamente recortado no tamanho do gel e montado no suporte da cuba de transferência contendo tampão específico (0,063 M de Tris, 0,48 M de glicina e 20% de metanol, pH 8,3).

A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 2 horas à temperatura ambiente, onde uma diferença de potencial de 0,4 mA (80V) foi aplicada. Para a visualização das bandas transferidas, a membrana foi imersa em solução 0,5% de Ponceau 3R (Sigma) em ácido acético (Merck) a 5% por 10 minutos. Após o reconhecimento das bandas transferidas, os radicais livres do papel foram bloqueados pela imersão deste em solução de leite desnatado a 5% em PBS gelado por 30 minutos. A membrana foi, então, lavada por três vezes com PBS.

A membrana foi imersa em soro de coelho anti-PFC absorvido e diluído com PBS conforme o uso. Ao final de 2 horas de incubação em temperatura ambiente, repetiram-se as lavagens com PBS. Após isso, a membrana foi incubada por 1 hora em uma diluição 1:2000 de Imunoglobulina G de carneiro anti-IgG de coelho, conjugada com peroxidase (Sigma) em PBS. Após esse período, a membrana foi novamente lavada por 3 vezes com PBS.

A revelação foi realizada submergindo-se a membrana de nitrocelulose por até 10 minutos em solução de Diaminobenzidina - DAB (Sigma) onde 5 mg de DAB foram dissolvidos em 30 ml de PBS contendo 150 μ L de peróxido de hidrogênio (30 volumes Sigma). A reação foi interrompida pela lavagem do papel de nitrocelulose em água destilada. A membrana foi então colocada entre folhas de papel filtro para secar.

3.18 – ENSAIOS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA:

As cepas de *E. coli* CG1902-D e CG1905-B, foram cultivadas no meio de Minca e incubadas a 37°C e a 16°C. Em seguida foram suspensas em tampão TBS (Tris-HCl 0,05M, NaCl 0,15M) pH 7,4. Cinqüenta microlitros da suspensão foram colocados sobre grade de níquel com malha de 400 “mesh”, previamente recobertas com Formvar; após

30 minutos as grades foram lavadas com PBS (0,15 M pH 7,4) acrescido de 1% de Albumina de Soro Bovino (BSA) e de 1% de Tween 20 (PBS-BSA-T) (SHIMIZU *et al.*, 1987; GIRARDEAU *et al.*, 1988). Posteriormente, sobre as grades foram colocadas gotas do antissoro primário (anti-PFC) diluído 1:300 em PBS-BSA-T e, após novo período de 30 minutos, as grades foram novamente lavadas, secas e colocadas em contato com a suspensão do anticorpo secundário – anti-IgG de Coelho conjugado com ouro coloidal – na diluição de 1:10. Após 30 minutos as grades foram lavadas, secas e observadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo LEO906, pertencente ao Centro de Microscopia Eletrônica/IB – UNICAMP.

3.19 – ENSAIOS DE PCR PARA DETECÇÃO DA FÍMBRIA DO TIPO 1:

Para a detecção da fímbria do tipo 1, utilizamos iniciadores específicos para amplificar o gene *fimH*, conforme JOHNSON & STELL (2000), com os procedimentos descritos no item 3.3.2.

3.20 – ENSAIOS DE ADESÃO NAS LINHAGENS CELULARES Caco-2, HeLa, HEp-2 e HT-29:

As provas de aderência às células de linhagem contínua foram realizadas em células Caco-2 (carcinoma de cólon humano), HeLa (carcinoma epitelial de cérvix humana), HEp-2 (carcinoma de laringe humana) e HT-29 (carcinoma coloretal humano).

A metodologia de cultivo celular, cultivo das amostras em questão, preparo das microplacas contendo as linhagens celulares e a infecção propriamente dita foram aplicadas de maneira similar para todas as linhagens.

3.20.1 - PREPARO DAS CEPAS BACTERIANAS:

Na infecção das culturas, as cepas em teste e as cepas controle: C1845 - adesão localizada, E 2348/69 – adesão difusa, O431-1 – adesão agregativa e DH5 α – controle negativo foram cultivadas por 18 horas a 37°C em 3mL de TSB (Caldo de Triptona Soja - Difco), sendo posteriormente centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS (0,15 M, pH 7,4) e finalmente suspensas em 100 μ L do mesmo tampão.

3.20.2 - PREPARO DAS CÉLULAS EUCARIÓTICAS:

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular da área de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IB da UNICAMP, de acordo com as recomendações da Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti.

3.20.3 – ENSAIOS DE ADESÃO:

Para os ensaios de adesão a metodologia utilizada foi a descrita por SCALETSKY *et al.* (1984) com modificações. Foram utilizadas microplacas de 24 poços (Corning), com lamínulas redondas esterilizadas de 13 mm de diâmetro, para o cultivo das células eucarióticas ($1,2 \times 10^5$ células) cada poço contendo 1mL de meio Eagle modificado (M.E.M. Cultilab), acrescido de 10 % de soro fetal bovino (SFB - Cultilab) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina - Sigma) por 48 h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Antes da realização do ensaio, as células foram lavadas com PBS contendo 1% de D-manose e foi acrescentado M.E.M. contendo 2% de SFB e 1% de D-manose.

Um inóculo, em duplicata, de 40 µL de cada cultura bacteriana foi acrescentado a cada poço e as placas incubadas por 30 min. a 37°C (período de infecção). As células foram então lavadas com PBS (0,15M pH 7,4) acrescido de 1% de D-manose por seis vezes para retirada das bactérias não aderentes, sendo então acrescido M.E.M. com 2% de SFB e 1% de D-manose. A seguir as células foram incubadas por 3 h a 37°C (período de multiplicação).

Posteriormente as monocamadas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com corante May-Grunwald a 0,2% diluído 1:2 em tampão Sørensen e depois também coradas com Giemsa diluído 1:3 no mesmo tampão.

Após a secagem, as lamínulas foram retiradas e devidamente preparadas para observação e fotografia em microscópio óptico (Axioskop MC 80 DX – Carl Zeiss) e os critérios para definição do tipo de adesão utilizados foram os descritos por NATARO *et al.* (1985), LEVINE (1987) e SCALETSKY *et al.* (1988).

3.20.4 - ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE ADESÃO USANDO ANTISSORO ANTI-PFC:

De posse do antissoro contra a proteína PFC purificada, foi desenhado um experimento para que pudéssemos verificar se o antissoro obtido era capaz de inibir a adesão de cepas portadoras do PFC na linhagem de células Caco-2, sendo o cultivo das cepas e preparação das culturas celulares executados conforme os experimentos anteriores.

3.20.4.1 - DILUIÇÃO DO ANTISSORO E DOS CULTIVOS BACTERIANOS:

O antissoro foi diluído em PBS na razão 2, iniciando com diluição 1:15 até 1:60. O cultivo bacteriano CG-1905-B foi centrifugado e ressuspenso em PBS em turbidez equivalente ao nº 6 da escala de MacFarland.

Em tubos de ensaio foram adicionados volumes iguais de suspensão bacteriana e de antissoro diluído e, em seguida, incubados sob duas condições diferentes:

- 1) 18 horas de incubação a 37°C (**T1**);
- 2) 17 horas de incubação a 4°C, e 1 hora a 37°C (**T2**).

As células eucarióticas foram lavadas com PBS contendo 1% de D-manose acrescentando a cada poço 500µL de M.E.M. contendo 2% de SFB e 1% de D-manose. Ao poço do controle negativo adicionou-se 1mL de M.E.M.

A cada poço, em duplicata, exceto os dos controles negativos, também foram adicionados 500µL de cada uma das misturas soro diluído/suspensão bacteriana, controles positivos e negativos relacionados a seguir:

Tratamento 1, diluição 1:15 (2 poços);

Tratamento 1, diluição 1:30 (2 poços);

Tratamento 1, diluição 1:60 (2 poços);

Tratamento 2, diluição 1:15 (2 poços);

Tratamento 2, diluição 1:30 (2 poços);

Tratamento 3, diluição 1:60 (2 poços);

500µL Controle Positivo (250µL da cepa CG-1905-B + 250µL de M.E.M.);

500µL Controle de soro diluído 1:5, 1:30, 1:60;

Controles com as linhagens padrão de *E.coli* para cada tipo de adesão (agregativa, difusa e localizada) na proporção 460 μ L de M.E.M. + 40 μ L de suspensão bacteriana.

As placas foram incubadas por 30 min. a 37°C (período de infecção). As etapas de lavagem, fixação e coloração foram executadas observando o método descrito no item 3.20.3. Em seguida as lâminas foram observadas sob microscopia ótica.

3.21 - ANÁLISES DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA PFC:

Dando continuidade aos estudos comparativos entre as proteínas principais dos fatores de colonização F4, F41, CS31A e PFC, utilizamos o algoritmo PSIPRED (<http://globin.bio.warwick.ac.uk/psipred>) que, com base na seqüência de aminoácidos, faz estimativas da estrutura secundária da proteína (McGUFFIN *et al.*, 2000).

Resultados

4 – RESULTADOS:

4.1 - SELEÇÃO DOS INICIADORES PARA O GENE PRINCIPAL DO PFC:

Para o alinhamento apresentado nas FIGURAS 4 e 5, a seguir, buscamos o máximo ajustamento entre os genes *faeF* e *clpF*, e entre os genes *faeH* e *clpH* dos FC de *E. coli*.

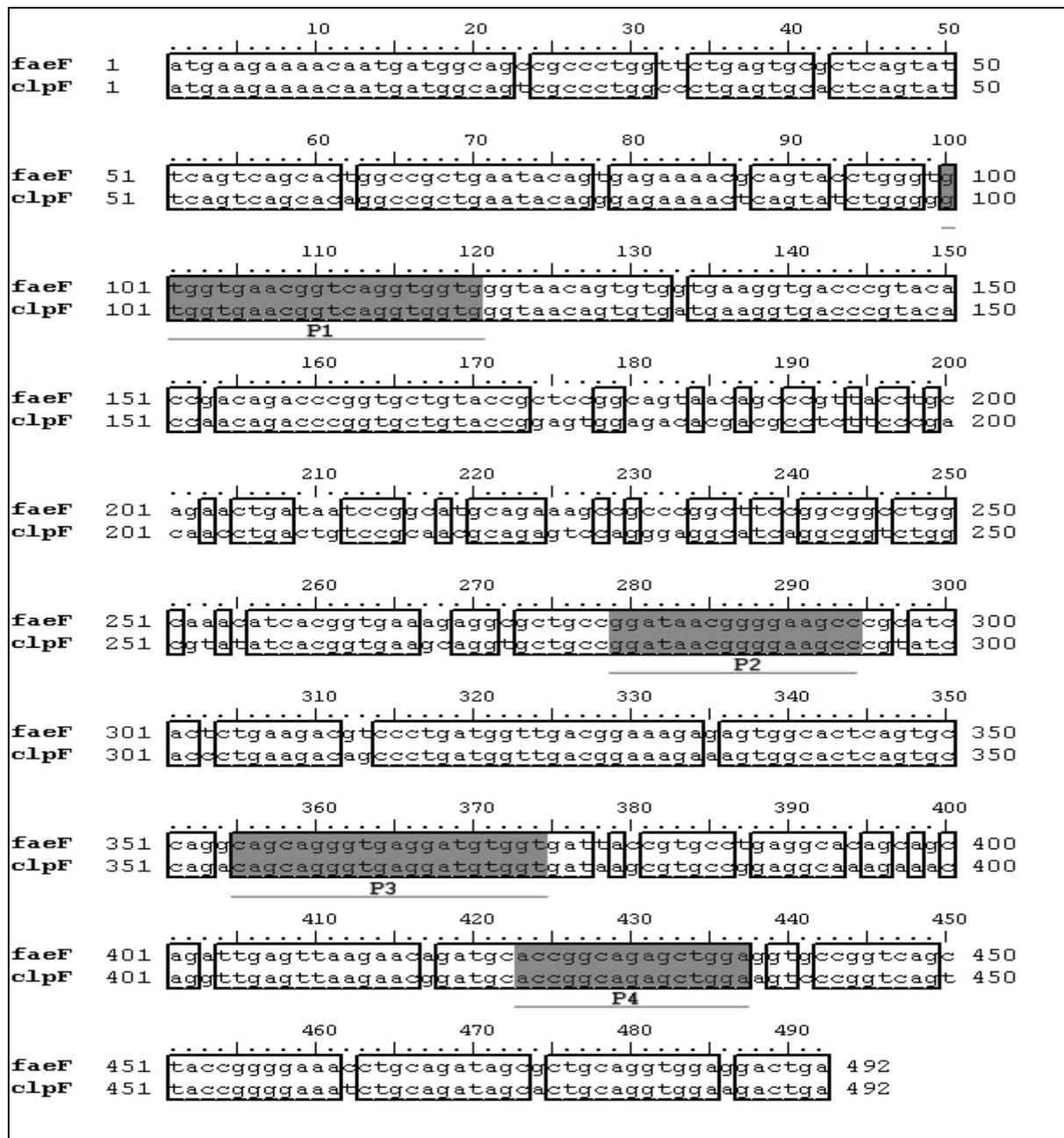


FIGURA 4: Alinhamento dos genes *faeF* e *clpF* de *E. coli*. Os boxes brancos referem-se aos nucleotídeos que são iguais em ambas as seqüências; as regiões em cinza foram escolhidas para a construção dos iniciadores, que estão indicados pelas siglas P1, P2, P3 e P4.

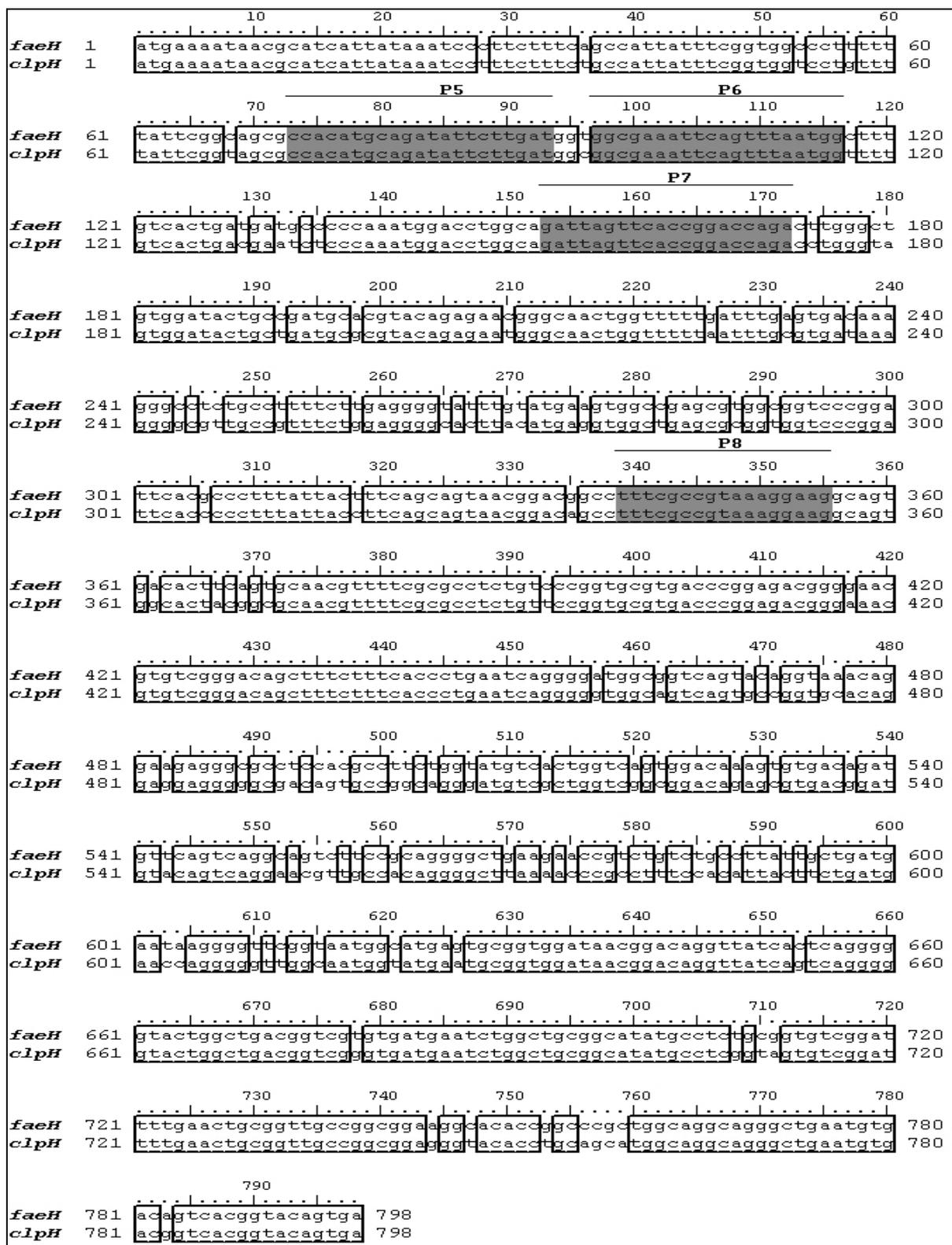


FIGURA 5: Alinhamento dos genes *faeH* e *clpH* de *E. coli*. Os boxes brancos referem-se aos nucleotídeos que são iguais em ambas as seqüências; as regiões em cinza foram escolhidas para a construção dos iniciadores, que estão indicados pelas siglas P5, P6, P7 e P8.

De posse dessas homologias, e após comparação dos genes, selecionamos oito iniciadores, quatro nos genes à montante dos genes *faeG* e *clpG*, e quatro na fita complementar nos genes à jusante dos genes *faeG* e *clpG*, como evidenciado no modelo apresentado na FIGURA 2, na página 31.

P1	5'- GTG GTG AAC GGT CAG GTG -3'	(ANELA NA FITA COMPLEMENTAR)	
P2	5'- GGA TAA CGG GGA AGC C -3'	(ANELA NA FITA COMPLEMENTAR)	
P3	5'- CAG CAG GGT GAG GAT GTG -3'	(ANELA NA FITA COMPLEMENTAR)	
P4	5'- ACC GGC AGA GCT GGA -3'	(ANELA NA FITA COMPLEMENTAR)	
P5	5'- ATC AAG AAT ATC TGC ATG TGG -3'	(ANELA NA FITA CODANTE)	
P6	5'- CCA TTA AAC TGA ATT TCG CC -3'	(ANELA NA FITA CODANTE)	
P7	5'- GTC TGG TCC GGT GAA CTA ATC -3'	(ANELA NA FITA CODANTE)	
P8	5'- CCT TCC TTT ACG GCG AAA -3'	(ANELA NA FITA CODANTE)	
Combinções e tamanhos de fragmentos esperados:			
P1 + P5 = 1767 pb	P2 + P5 = 1588 pb	P3 + P5 = 1512 pb	P4 + P5 = 1444 pb
P1 + P6 = 1782 pb	P2 + P6 = 1603 pb	P3 + P6 = 1527 pb	P4 + P6 = 1459 pb
P1 + P7 = 1838 pb	P2 + P7 = 1659 pb	P3 + P7 = 1583 pb	P4 + P7 = 1515 pb
P1 + P8 = 2024 pb	P2 + P8 = 1845 pb	P3 + P8 = 1769 pb	P4 + P8 = 1701 pb

FIGURA 6: Sequência dos iniciadores para amplificação do gene da proteína principal do PFC de *E. coli*, combinações utilizadas e tamanhos esperados dos produtos amplificados (em pares de base – pb).

4.2 - ENSAIOS DE PCR COM OS INICIADORES DESENHADOS:

Para verificar a funcionalidade dos iniciadores, estes foram avaliados em reações de PCR frente aos fatores de colonização que compõem a família, F4, F41 e CS31A.

Os produtos amplificados obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, fotografados e posteriormente analisados através do software de análise de imagens ImageMaster TotalLab versão 1.11 (Amersham Pharmacia Biotech) sendo assim seu tamanho molecular estimado, com base na comparação com fragmentos de tamanho conhecido.

Nas FIGURAS 7 a 12 estão os resultados das 16 combinações possíveis dos iniciadores frente às cepas padrão F4⁺, F41⁺ e CS31A⁺.

As bandas de interesse estão presentes em cada uma das fotografias, e é possível observar que as bandas são levemente maiores que as outras dentro de cada combinação (por exemplo: P1 com P4 é menor que P1 com P5, que por sua vez é menor que P1 com P6), como mostrado na FIGURA 6, sendo que o menor fragmento a ser obtido é o que combina P4 com P5 e o maior fragmento é resultado da combinação de P1 com P8.

Na FIGURA 7 tem-se a amplificação em todas as combinações testadas, que são as localizadas na altura aproximada dos 1500 pares de base, de acordo com o apresentado na FIGURA 6. Em todas as canaletas foram observadas bandas inespecíficas com peso molecular abaixo daquelas esperadas.

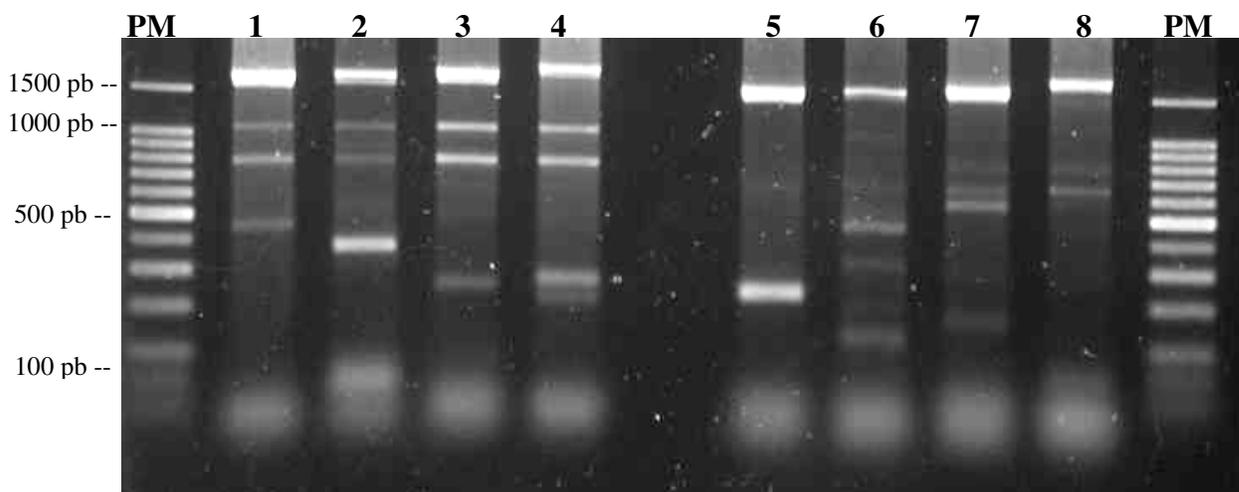


FIGURA 7: PCR da cepa padrão F4+ de *E.coli*, com diferentes combinações dos iniciadores. Legenda: 1 – P1/P5; 2) – P1/P6; 3) P1/P7; 4) P1/P8; 5) P2/P5; 6) P2/P6; 7) P2/P7; 8) P2/P8. PM: padrão de peso molecular 100 bp DNA ladder Promega.

Na FIGURA 8, ao avaliarmos a funcionalidade das outras combinações possíveis para os iniciadores frente ao F4, observamos também a presença de bandas inespecíficas e verificamos que algumas das reações não aconteceram como pode ser observado nas combinações P3/P8, P4/P7 e P4/P8.

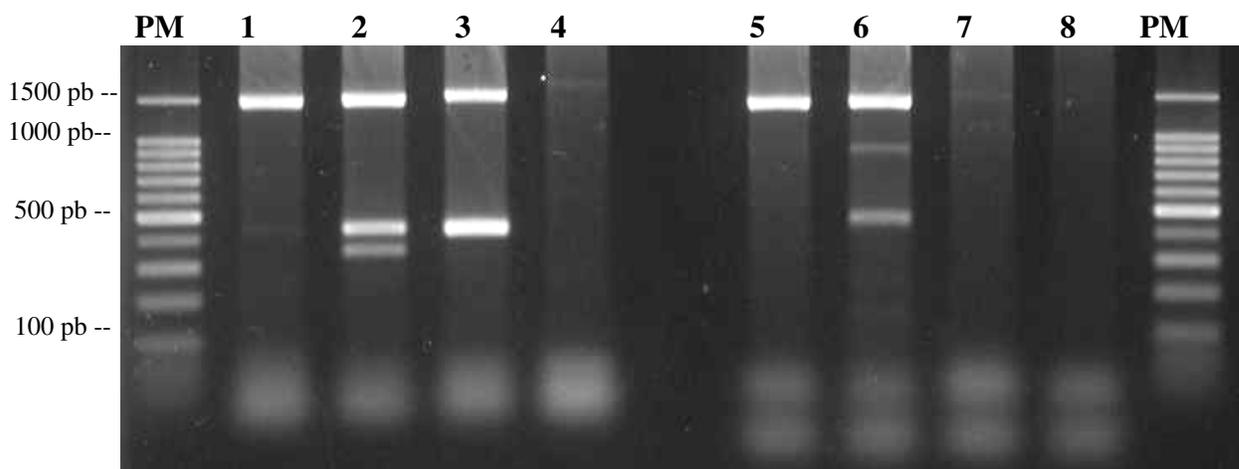


FIGURA 8: PCR da cepa padrão F4+ de *E.coli*, com diferentes combinações dos iniciadores. Legenda: 1 – P3/P5; 2) – P3/P6; 3) P3/P7; 4) P3/P8; 5) P4/P5; 6) P4/P6; 7) P4/P7; 8) P4/P8. PM: padrão de peso molecular 100 bp DNA ladder Promega.

Na FIGURAS 9 e 10, quando utilizamos a cepa padrão para o CS31A, verificamos também que as combinações que não apresentaram reação positiva foram as mesmas que não funcionaram com a cepa padrão F4: as combinações P3/P8, P4/P7 e P4/P8.

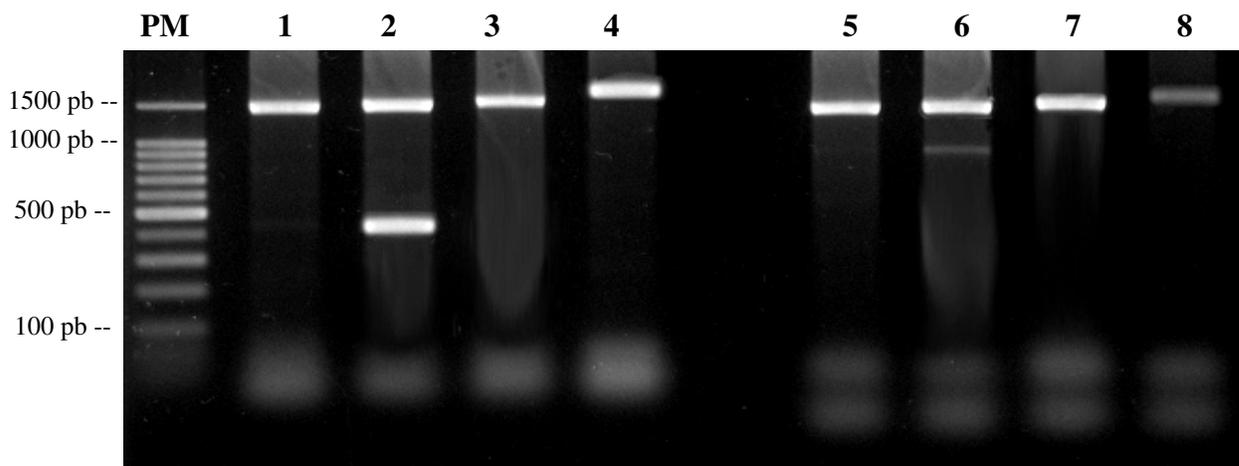


FIGURA 9: PCR da cepa padrão CS31A+ de *E.coli*, com diferentes combinações dos iniciadores. Legenda: 1 – P1/P5; 2) – P1/P6; 3) P1/P7; 4) P1/P8; 5) P2/P5; 6) P2/P6; 7) P2/P7; 8) P2/P8. PM: padrão de peso molecular 100 bp DNA ladder Promega.

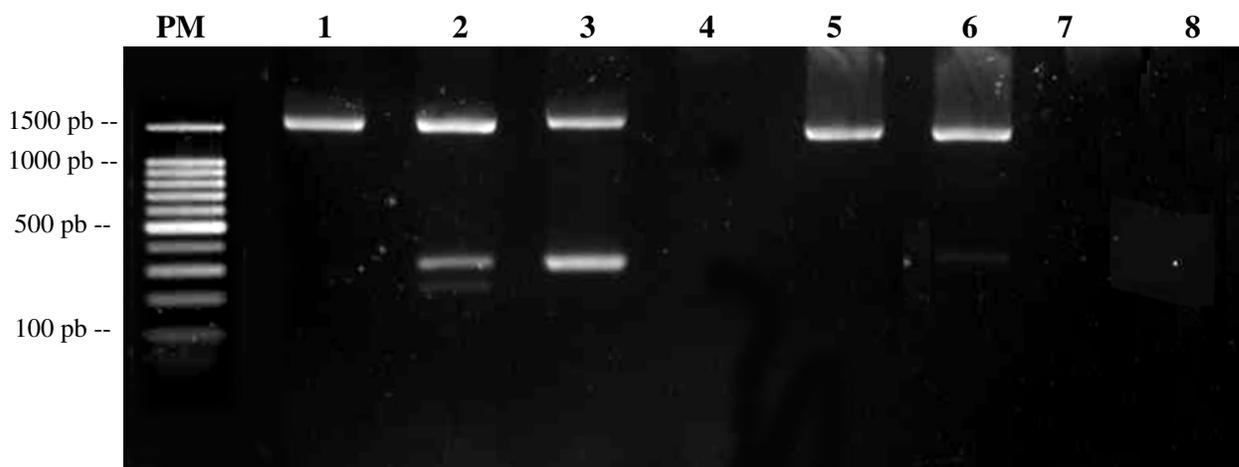


FIGURA 10: PCR da cepa padrão CS31A+ de *E.coli*, com diferentes combinações dos iniciadores. Legenda: 1 – P3/P5; 2) – P3/P6; 3) P3/P7; 4) P3/P8; 5) P4/P5; 6) P4/P6; 7) P4/P7; 8) P4/P8. PM: padrão de peso molecular 100 bp DNA ladder Promega.

No caso das amplificações utilizando a cepa padrão para o F41, obtivemos muitos resultados inesperados, onde muitas canaletas não apresentaram bandas na altura esperada, embora tenhamos observado muitas bandas inespecíficas (FIGURAS 11 e 12)

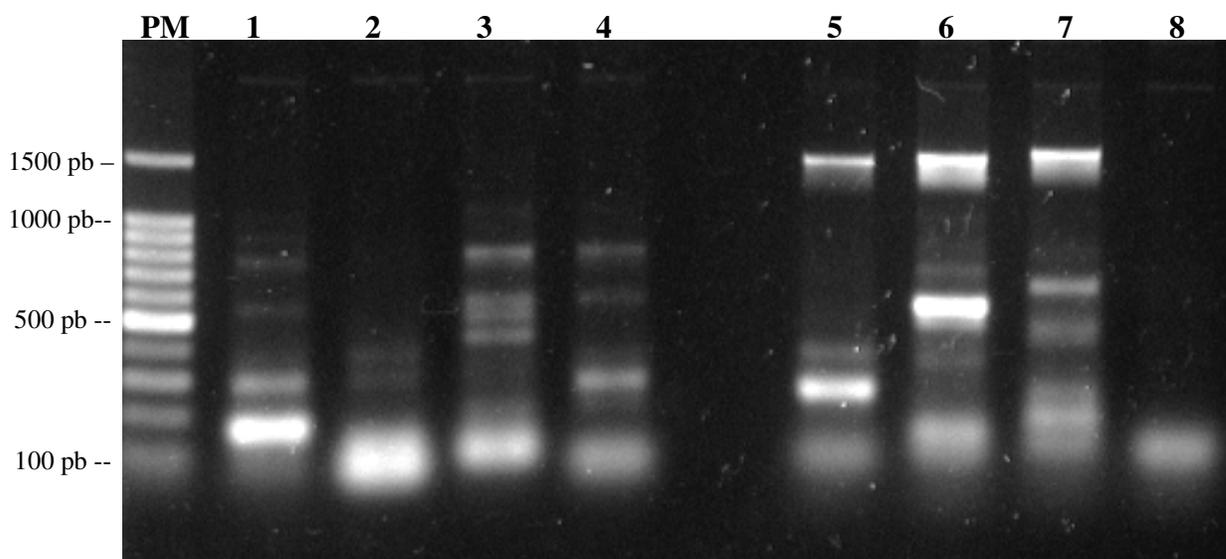


FIGURA 11: PCR da cepa padrão B41M (F41+) de *E.coli*, com diferentes combinações dos iniciadores. Legenda: 1 – P1/P5; 2) – P1/P6; 3) P1/P7; 4) P1/P8; 5) P2/P5; 6) P2/P6; 7) P2/P7; 8) P2/P8. PM: padrão de peso molecular 100 bp DNA ladder Promega.

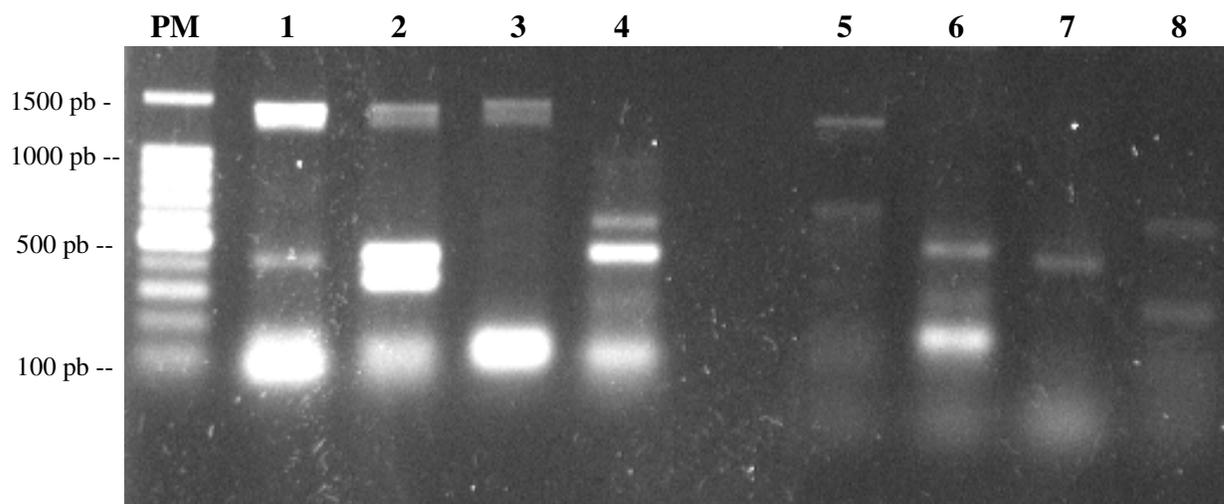


FIGURA 12: PCR da cepa padrão B41M (F41+) de *E.coli*, com diferentes combinações dos iniciadores. Legenda: 1 – P3/P5; 2) – P3/P6; 3) P3/P7; 4) P3/P8; 5) P4/P5; 6) P4/P6; 7) P4/P7; 8) P4/P8. PM: padrão de peso molecular 100 bp DNA ladder Promega.

Na FIGURA 12 também observamos reações positivas na região dos 1500 pb, reação mais intensa em P3 com P5 e reações bastante tênues em P3 com P6 e P3 com P7. Observamos bandas inespecíficas na combinação P3 com P8 e nas combinações envolvendo P4 não obtivemos qualquer banda de interesse, exceto na combinação entre P4 com P5, que apresentou uma banda de fraca intensidade.

4.3 – PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO NOS ENSAIOS DE PCR:

Nos ensaios de PCR efetuamos diversas alterações na temperatura de anelamento (inicialmente ajustada para 58°C) visando padronizar as condições de reação, utilizando termocilador MasterCycle Gradient (Eppendorf). Com reações em gradiente de temperatura conseguimos reações positivas que apresentaram apenas as bandas de interesse quando a temperatura de anelamento era de 65°C. A partir desta temperatura, as bandas ficaram bem mais fracas, como na temperatura de 67,6°C até desaparecerem por completo (68,9°C e 70,5°C); não foi necessário alterar a quantidade de iniciadores utilizada nas reações (300 ng), pois com esta quantidade as reações aconteceram de maneira satisfatória.

Apresentamos a seguir os resultados das reações com os iniciadores P4 e P5 com a linhagem padrão para o F4 (FIGURA 13), cujo produto amplificado esperado (cerca de 1500 pares de bases) seria o mais adequado para os estudos de seqüenciamento por serem os menores obtidos com a combinação entre os iniciadores, como descrito na FIGURA 6.

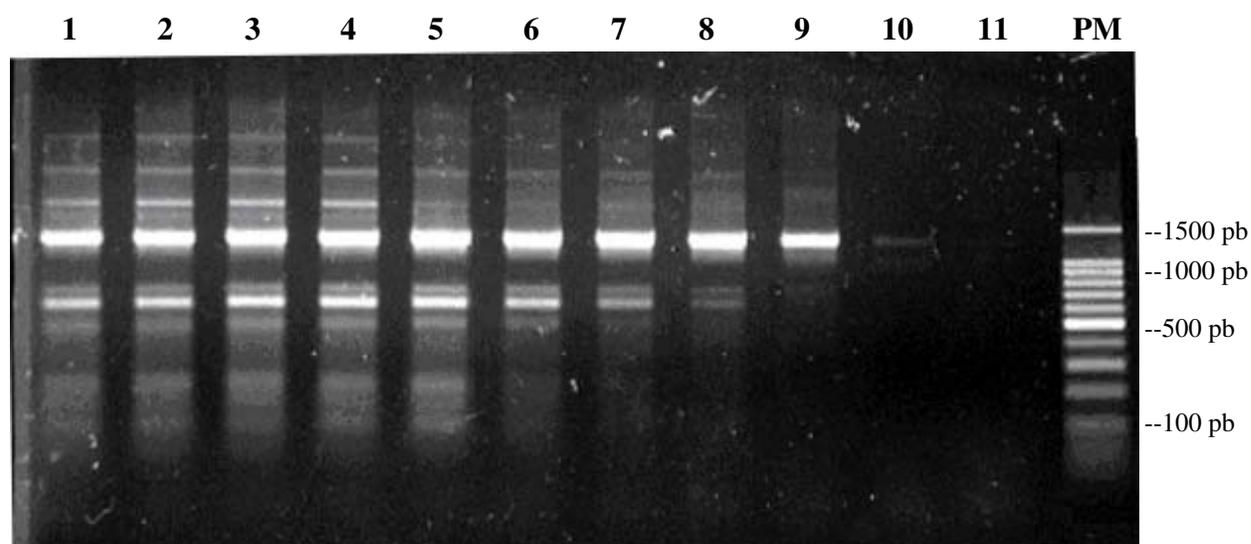


FIGURA 13: PCR da linhagem F4+ de *E.coli* com os iniciadores P4 e P5 em gradiente de temperatura. Legenda: 1 - 50,0°C; 2- 50,3°C; 3 - 51,4°C; 4 - 53,2°C; 5 - 55,5°C; 6 - 58,1°C; 7 - 60,8°C; 8 - 63,5°C; 9 - 65,0°C; 10 - 67,6°C, 11 - 68,9°C; 12 - 70,5°C. PM: padrão de peso molecular 100 bp DNA ladder

4.4 – PCR DAS CEPAS DE CAMPO PARA DETECÇÃO DO GENE DO PFC:

Utilizamos o protocolo padronizado à temperatura de 65°C com as 41 cepas envolvidas neste estudo.

Neste ensaio obtivemos 35 cepas positivas (QUADRO 4, pág 75), o que equivale a 85,3% do total inicial de cepas envolvidas neste estudo. Das cepas que não apresentaram reação positiva, quatro são portadoras de outros fatores de colonização e duas não portavam nenhum outro FC, como descrito no Quadro 02, pág. 29. Para exemplificar esses resultados apresentamos a FIGURA 14, como resultado da análise de algumas dessas cepas.

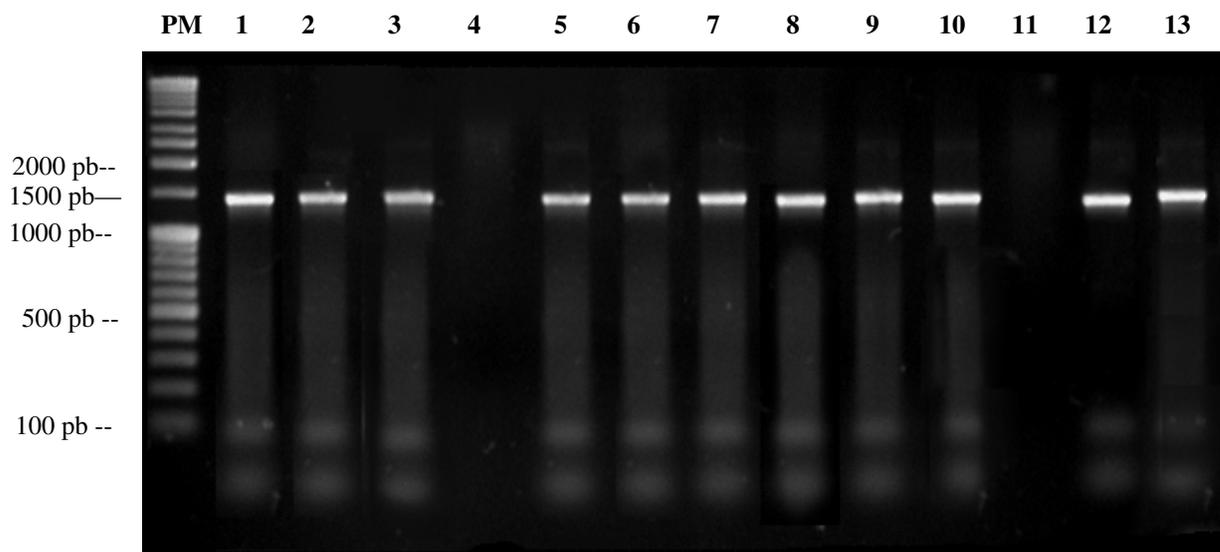


FIGURA 14: PCR das cepas de *E.coli* isoladas de bovinos com os iniciadores P4 e P5. Legenda: 1 - linhagem padrão F4+; 2 - 57(B1); 3 - 111(2); 4 - 417(C2-2); 5 - 1167(D-7); 6 - 1162(D-10); 7 - 3106(C-4); 8 - E57(14)26; 9 - E57(15)10; 10 - E57(19)13; 11 - E57(25)05; 12 - E57(40)19; 13 - E57(43)22. PM: padrão de peso molecular 1kb DNA ladder Promega.

4.5 – LOCALIZAÇÃO DO GENE PARA A SUBUNIDADE PRINCIPAL DO PFC:

Nas 41 cepas estudadas não encontramos um perfil plasmidial que permitisse agrupá-las. Além disso, algumas das cepas não apresentaram plasmídios, mas ainda assim são positivas para o PFC em reações de PCR utilizando o DNA molde obtido do lisado bacteriano, sugerindo que o gene PFC está localizado no cromossomo bacteriano (Dados não apresentados).

4.6 - ENSAIOS DE SEQÜENCIAMENTO:

Enviamos os amplificados dos ensaios de PCR de algumas das cepas positivas para seqüenciamento no LNLS, e obtivemos resultados satisfatórios com as cepas CG 1902-D e CG 1905-B, além das linhagens padrão para o F4, F41 e CS31A.

Com as linhagens padrão, as seqüências obtidas foram semelhantes às aquelas descritas em literatura para o F4, F41 e CS31A quando comparadas utilizando-se o programa Blast (dados não apresentados).

Os eletroferogramas (resultados dos seqüenciamento), quando devidamente

processados, resultaram na seqüência que corresponde ao gene que codifica a subunidade principal do PFC (FIGURA 15).

Para determinar a seqüência de aminoácidos do PFC, utilizamos o software BioEdit; para a tradução do gene a partir do primeiro códon ATG onde, como já exposto encontra-se o início da homologia entre os genes *faeG*, *clpG*, *fimF41* e o gene do PFC obtivemos a cadeia polipeptídica de 282 aminoácidos (representados com o símbolo de uma letra apenas), apresentada na Figura 16.

5	15	25	35	45	55	
5'	ATGAAAAAGA	CTTTGATTGC	ACTGGCTGTG	GCTGCCTCTG	CTGTATCTGG	TATGGCACAT
65	75	85	95	105	115	
	GCCTGGACGA	ATGGTGATTT	CAATGGTTCG	GTTGATATCG	GTGGTAGTAT	CACTGCAGAT
125	135	145	155	165	175	
	GATTATCGTC	AGAAATGGTC	ATGGGCAGTT	GGTAGCGACA	TCAATGGATT	TAGTAATGCA
185	195	205	215	225	235	
	TTAACGGATC	TGACTGACGG	TGGAACCAA	CTGACCATTA	CTGTAAGTGG	TAATAAGCCA
245	255	265	275	285	295	
	ATCCTGTTAG	GTAAGACAAC	TGAAGCGTTT	GCTGCTCCAG	TTGATGCAGG	CGTGGGAGCA
305	315	325	335	345	355	
	AAACCTCAA	TTACCTTTAC	TGATTATGAA	GGACAAAAAG	TCGCATTGCA	GTATGAGCAT
365	375	385	395	405	415	
	AATAACAAGG	ATGGCTTGGG	TTATTTTGTG	TTGCCAATGA	AAAATACCGA	TGGTACTAAG
425	435	445	455	465	475	
	ATCGGTAGCC	TTAAGGCTAA	TGTGGCTTAT	GCTGGTGCGG	CATCTGTTGG	TAAAGATGGT
485	495	505	515	525	535	
	CAAGGCTACA	TTGGTTCACT	TTCTGAACGA	GACTGGAGTA	TCTTTAAGGG	GGGCTTAGGT
545	555	565	575	585	595	
	GCATATGGTT	CAGCATCAGT	GCTGGATGGC	GGGGATGCGG	CTGCCGAACG	TACTGCTTTA
605	615	625	635	645	655	
	TTCGGTTTCGT	TATCTCAAGC	CCGAGATGCT	TCAACAGATT	CAAGCCCGAA	AATGCAGGAG
665	675	685	695	705	715	
	TTTCCGGTCT	TGACAGCCCG	TACTGGTTCT	ATTGGTGAGA	ATATGAAATA	CACTGATGGA
725	735	745	755	765	775	
	ACTGTTGTTT	CAACANCATA	TGCAATGGGT	ATTGCTAACG	GTCAGACTAT	TGAGGCGACT
785	795	805	815	825	835	
	TTTGATCAAG	CTGTAACGTC	CAGCACTCAA	TGGAGCGCTC	CGCTGAACGT	AGCAGTTACT
845						
	TATAACTAA	3'				

FIGURA 15: Sequência (5'-3') de nucleotídeos do gene que codifica a subunidade principal do PFC de *E. coli*. Os números indicam a posição dos nucleotídeos.

....	
5	15	25	35	45	55	
MKKT	LIALAV	AASAVSGMAH	AWTNGDFNGS	VDIGGSITAD	DYRQKSWAV	GSDINGFSNA
....	
65	75	85	95	105	115	
LTDLTDGGTK	LTITVSGNKP	ILLGKTTEAF	AAPVDAGVGA	KPQITFTDYE	GQKVALQYEH	
....	
125	135	145	155	165	175	
NNKDGLGYFV	LPMKNTDGTK	IGSLKANVAY	AGAASVGKDG	QGYIGLSLSE	DWSIFKGGGLG	
....	
185	195	205	215	225	235	
AYGSASVLDG	GDAAAERTAL	FGSLSQARDA	STDSSPKMQE	FPVLTARTGS	IGENMKYTDG	
....	
245	255	265	275	282		
TVVSTXYAMG	IANGQTIEAT	FDQAVTASTQ	WSAPLNVAVT	YN		

FIGURA 16: Seqüência deduzida de aminoácidos da proteína da subunidade principal do PFC. Legenda: A – alanina; D – ácido aspártico; E – ácido glutâmico; F – fenilalanina; G – glicina; H – histidina; I – isoleucina; K – lisina; L- leucina; M – metionina; N – asparagina; P – prolina; Q – glutamina; R – arginina; S- serina; T- treonina; V – valina; W- triptofano; Y – tirosina.

Segundo o programa PROTPARAM, a proteína da subunidade principal do PFC tem peso molecular estimado de 29,2 kDA e um ponto isoelétrico teórico de 4,94.

4.7 - RESULTADO DAS COMPARAÇÕES COM OS GENES PARA F4, F41 E CS31A:

Utilizando o programa Blast para comparar a seqüência obtida do gene da subunidade principal do PFC com as seqüências de F4, F41 e CS31A e conseguiu-se determinar a extensão da homologia entre elas e observar que o gene para o PFC tem semelhanças com regiões iniciais dos genes *faeG*, *clpG* e *fimF41*. No caso do F4 e do CS31A, determinou-se que essa homologia se estende também à porção terminal dos genes *faeG* e *clpG*. Optamos por apresentar esses resultados nas comparações entre os aminoácidos (FIGURAS 17 e 18).

4.8 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS:

Como foi feito com os genes, comparamos as seqüências de aminoácidos da proteína PFC com aquelas dos FCs F4, F41 e CS31A e com a da subunidade principal da Fímbria do Tipo 1.

Utilizando o software CLUSTALW e inserindo as seqüências dos quatro FCs de colonização obtidas no GenBank e a seqüência do PFC determinada neste estudo, obtivemos os seguintes valores de homologia: PFC/FaeG (49,7%), PFC/ClpG (35,4%), PFC/FimF41 (29,4%) e PFC/FimA (18,1%).

As comparações estão apresentadas sob uma matriz de similaridade (QUADRO 03) que o CLUSTALW produz ao comparar as cadeias de cada um dos FC.

QUADRO 03: MATRIZ DE SIMILARIDADE ENTRE OS DIFERENTES FATORES DE COLONIZAÇÃO PRESENTES EM *E. coli* DE ORIGEM ANIMAL E O PFC.

	PFC	FaeG	ClpG	FimF41	FimA
PFC	1,000	0,497	0,354	0,294	0,181
FaeG (F4)	---	1,000	0,346	0,298	0,190
ClpG (CS31A)	---	---	1,000	0,324	0,197
FimF4 (F41)	---	---	---	1,000	0,197
FimA (Fímbria tipo 1)	---	---	---	---	1,000

Legenda: PFC: proteína principal do Possível Novo Fator de Colonização; FaeG: proteína principal do F4(K88); ClpG: proteína principal do CS31A; FimF41: proteína principal do F41; FimA: proteína principal da Fímbria Tipo 1

As figuras 19 e 20 representam o alinhamento individual de cada um dos aminoácidos da proteína principal dos fatores de colonização F4, F41 e CS31A e da Fímbria do Tipo 1 frente à proteína da subunidade principal do PFC. Os aminoácidos em boxes brancos são idênticos nas duas seqüências e os em boxes cinza são aminoácidos com as mesmas características (polares e apolares).

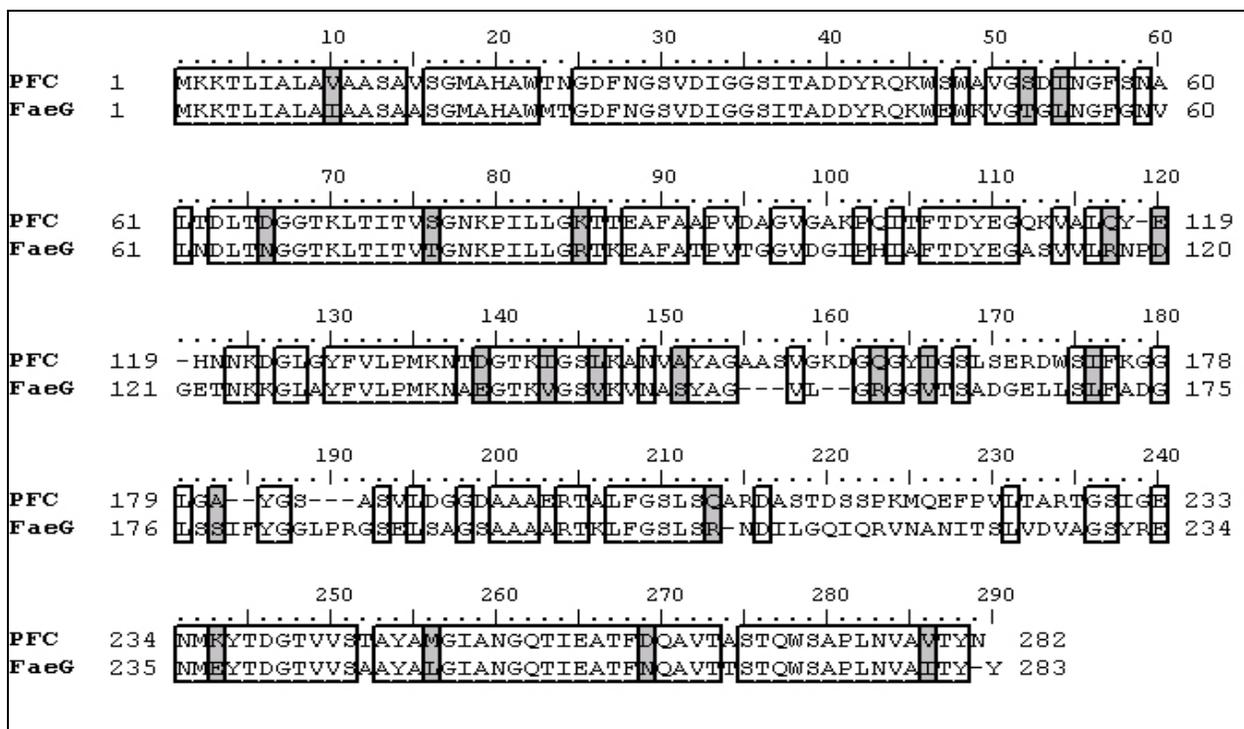


FIGURA 17: Alinhamento entre os aminoácidos da proteína da subunidade principal do PFC de *E.coli* com aqueles da proteína FaeG (F4) de *E.coli*. Traços foram incluídos para proporcionar alinhamento ótimo entre as seqüências.

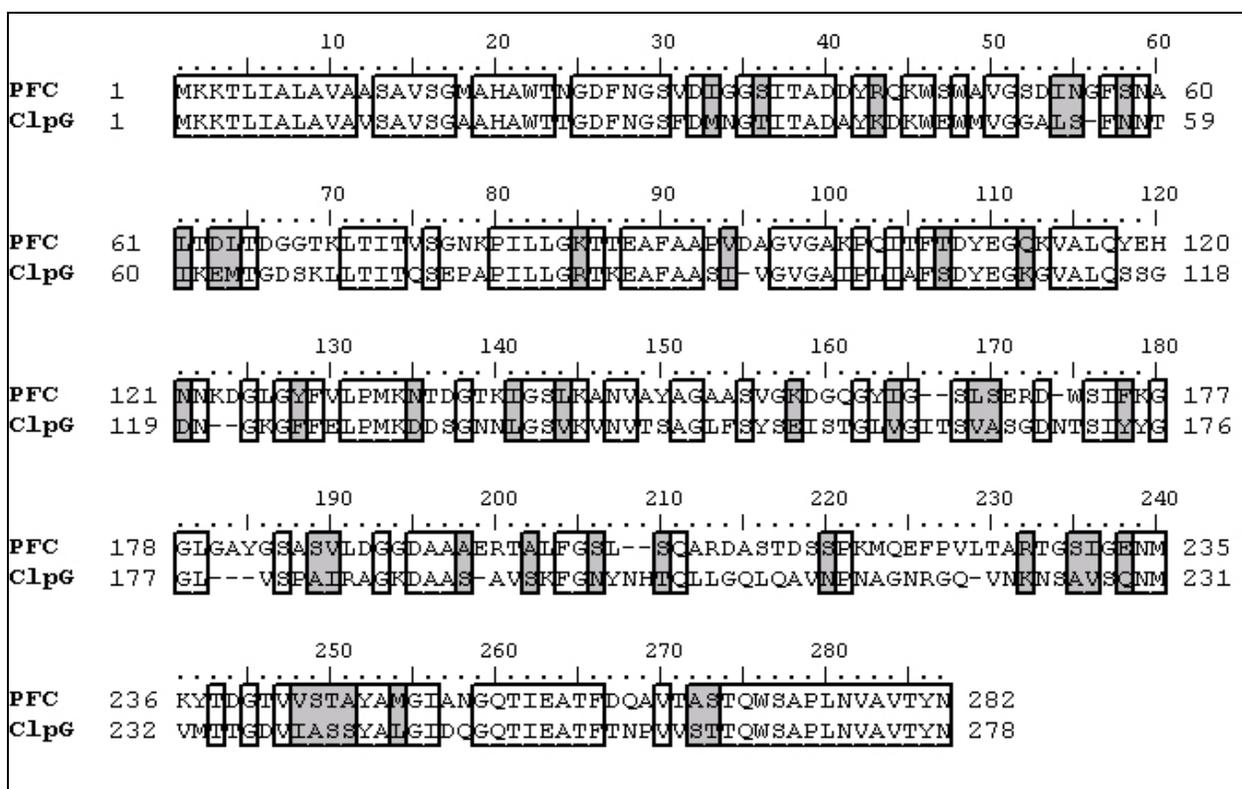


FIGURA 18: Alinhamento entre os aminoácidos da proteína da subunidade principal do PFC de *E.coli* com aqueles da proteína ClpG (CS31A) de *E.coli*. Traços foram incluídos para proporcionar alinhamento ótimo entre as seqüências.

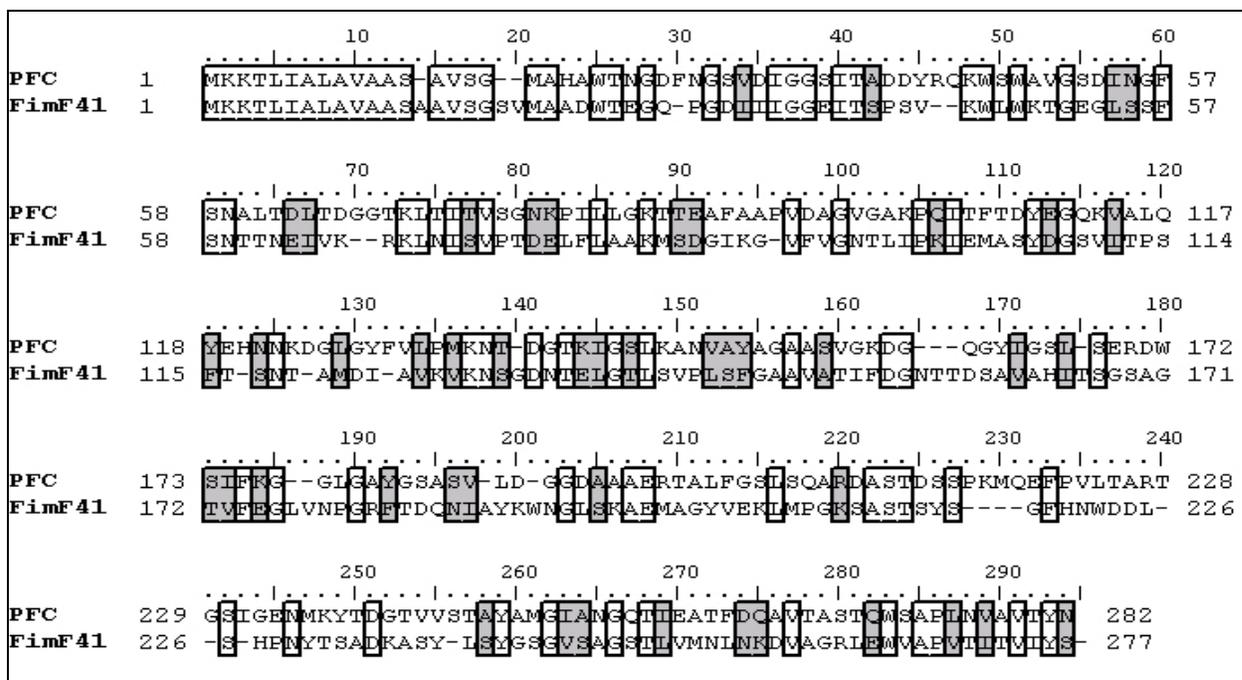


FIGURA 19: Alinhamento entre os aminoácidos da proteína da subunidade principal do PFC de *E.coli* com aqueles da proteína FimF41 (F41) de *E.coli*. Traços foram incluídos para proporcionar alinhamento ótimo entre as seqüências.

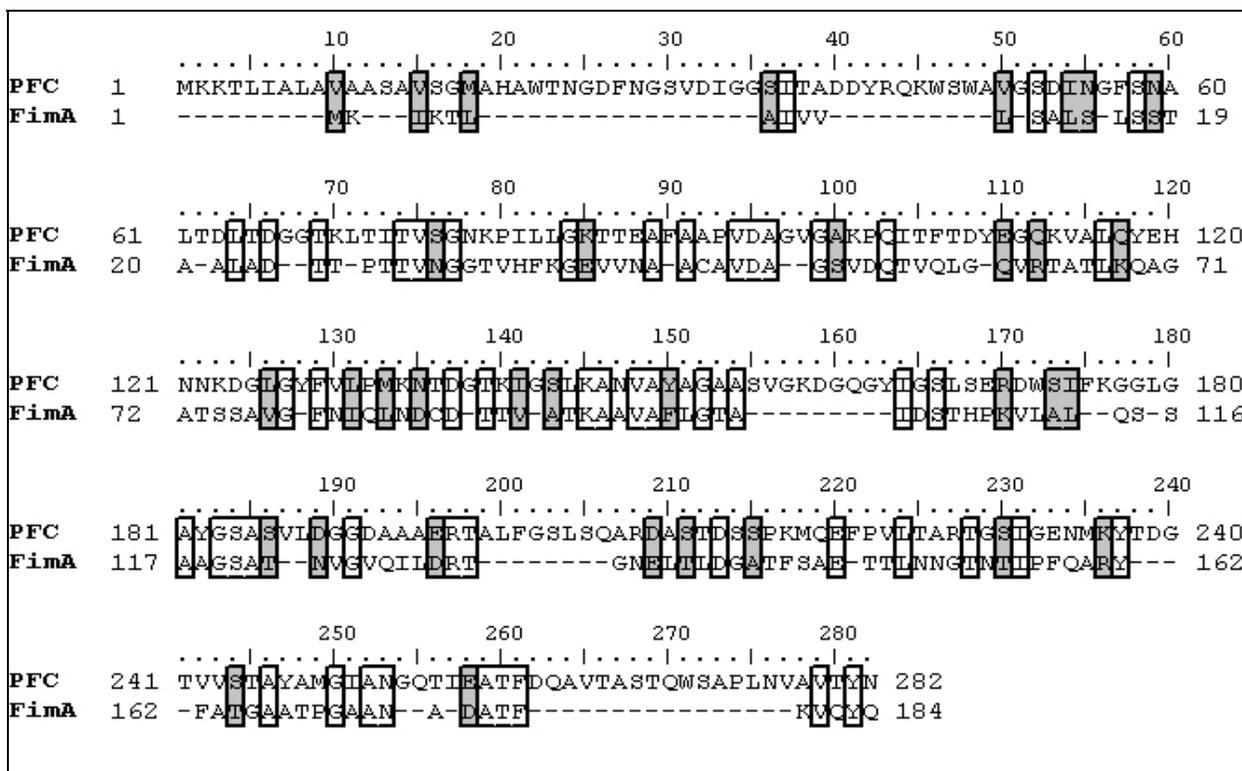


FIGURA 20: Alinhamento entre os aminoácidos da proteína da subunidade principal do PFC de *E.coli* com aqueles da proteína FimA (Fímbria do Tipo I) de *E.coli*. Traços foram incluídos para proporcionar alinhamento ótimo entre as seqüências.

Com esses dados, o programa Mega montou a árvore filogenética apresentada na Figura 21:

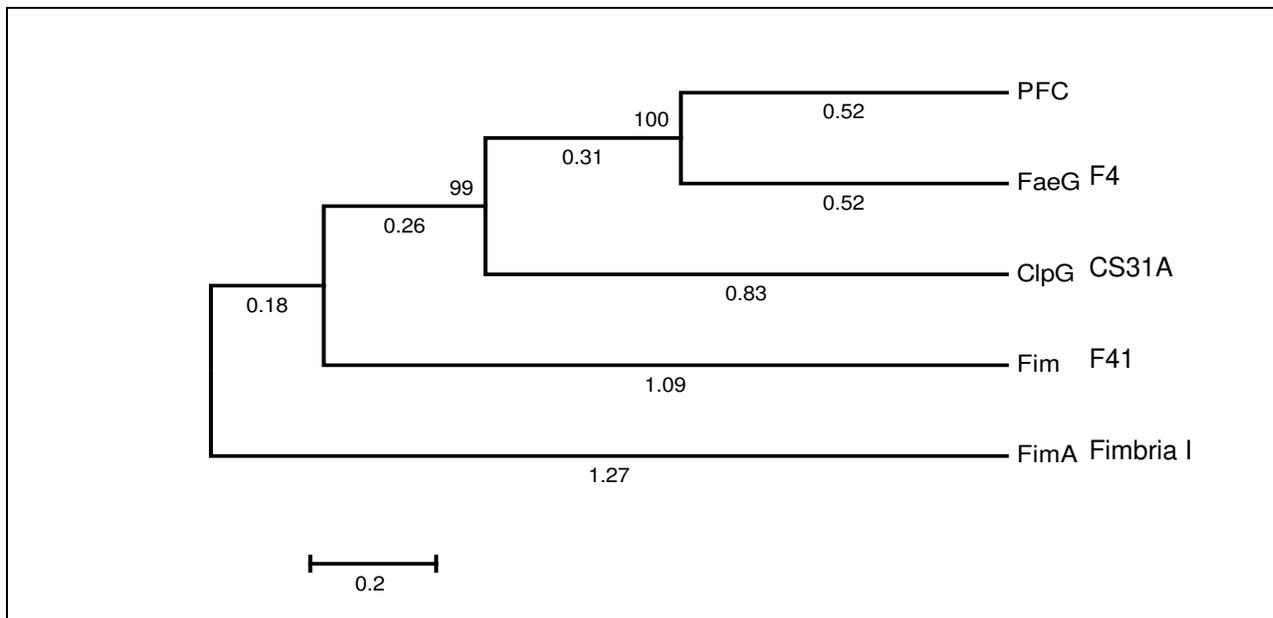


FIGURA 21: Árvore filogenética preparada a partir das seqüências de aminoácidos das subunidades principais de diferentes fatores de colonização de *E.coli*. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância evolutiva entre as proteínas; os números abaixo dos ramos indicam essa distância; os ramos verticais são arbitrários; os números acima dos ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap nas quais as ramificações foram observadas. Legenda: PFC: proteína principal do Possível Novo Fator de Colonização; FaeG: proteína principal do F4(K88); ClpG: proteína principal do CS31A; FimF41: proteína principal do F41 e FimA: proteína principal da Fimbria do Tipo 1.

4.9 – ENSAIOS DE PCR PARA CLONAGEM DO GENE RESPONSÁVEL PELA SUBUNIDADE PRINCIPAL DO PFC:

Apresentamos a seguir os resultados das reações de PCR com os iniciadores TOPO-A e TOPO-B com as cepas de campo CG-1903-D e CG-1905-B, cujo produto amplificado esperado era de aproximadamente 850 pares de bases:

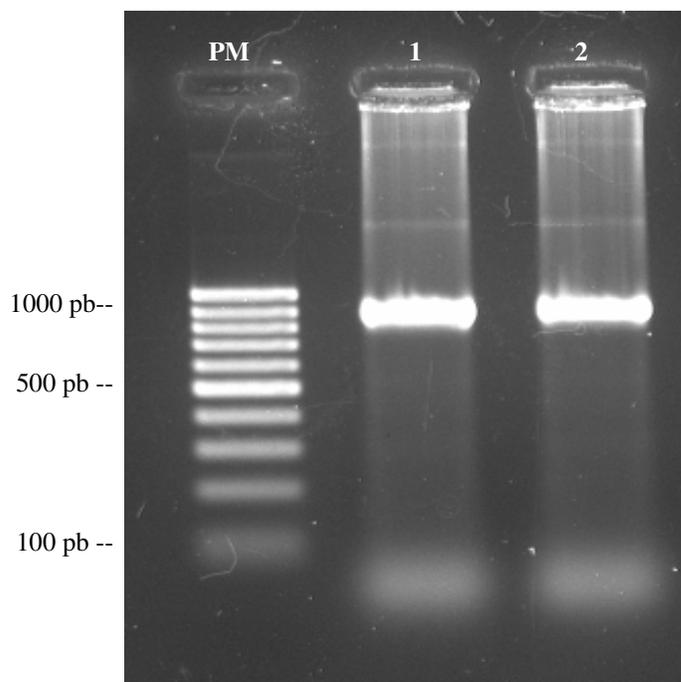


FIGURA 22: PCR das cepas CG1903-D e CG1905-B com os iniciadores TOPO-A e TOPO-B. Legenda: 1 -Padrão de Peso Molecular (Promega 100bp) DNA ladder; 2- CG-1903-D; 3 - CG1905-B

4.10 - EXPERIMENTOS DE TRANSFORMAÇÃO E CLONAGEM DOS PRODUTOS DE PCR:

Utilizando o produto obtido nas reações de PCR da etapa anterior, passamos a executar os experimentos de inserção do gene no vetor pET TOPO e conseqüente transformação das linhagens TOP10 e BL21 Star (DE3). A linhagem TOP10 foi transformada e cultivada em meio LB com carbenicilina (100µg/mL) após o que procedemos à extração plasmidial e à transformação da linhagem BL21 Star. Cultivamos em LB com antibióticos e também extraímos os plasmídios dessa linhagem,

para nos certificarmos de que se tratava do mesmo plasmídio (FIGURA 23). Segundo o fabricante do vetor, este tem um tamanho de 5760 pares de bases e, dessa forma, o peso molecular do plasmídio que contém o inserto de interesse teria o tamanho de 6610 pares de base, o que foi verificado em nossos experimentos.

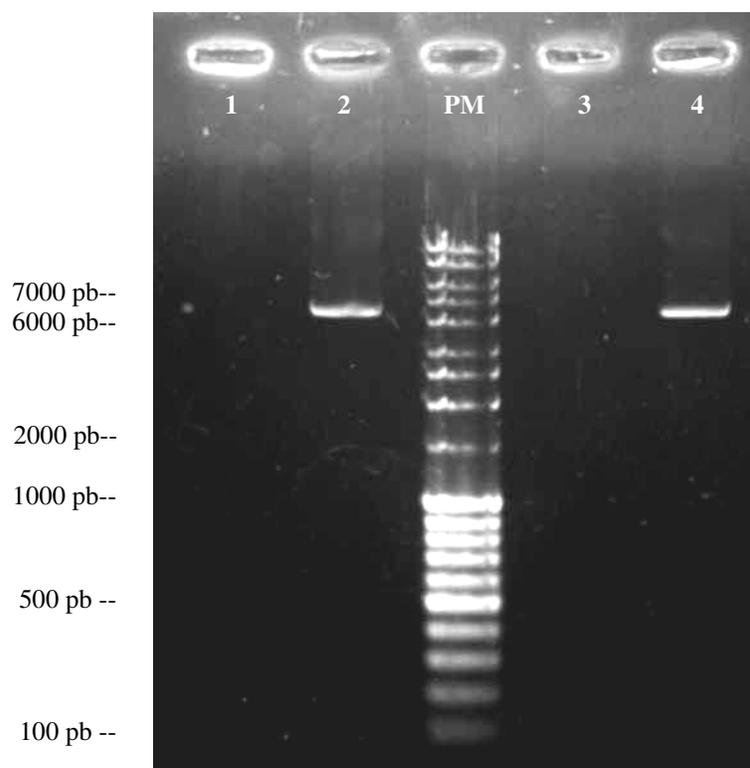


FIGURA 23: Gel da extração plasmidial das linhagens TOP10 e BL21 Star (DE3). Legenda: PM - Padrão de peso molecular: 1kb DNA ladder Promega; 1 e 3: linhagens TOP10 e BL21 Star (DE3) originais (sem plasmídios); 2 e 4: linhagens TOP10 e BL21 Star (DE3) transformadas.

4.11 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PFC:

Após 6 horas de cultivo com o agente indutor (IPTG 1mM), o cultivo foi centrifugado, ressuspenso com tampão de lise e sonificado em gelo visando a obtenção da maior quantidade de proteína recombinante sob forma solúvel possível evitando a presença de agregados da proteína (corpos de inclusão insolúveis), daí a presença de bandas intensas no extrato bruto (FIGURA 24).

Utilizamos sistema de cromatografia FPLC, em coluna de afinidade Ni-NTA (10 mL) para processar maiores volumes de meio de cultivo e assim obter maior quantidade

de proteína purificada. No caso do vetor utilizado, a banda correspondente à proteína purificada apresentou peso molecular de aproximadamente 46 kDa, resultado da adição da cauda de histidina (17,6 kDa) à proteína PFC propriamente dita, de aproximadamente 29 kDa.

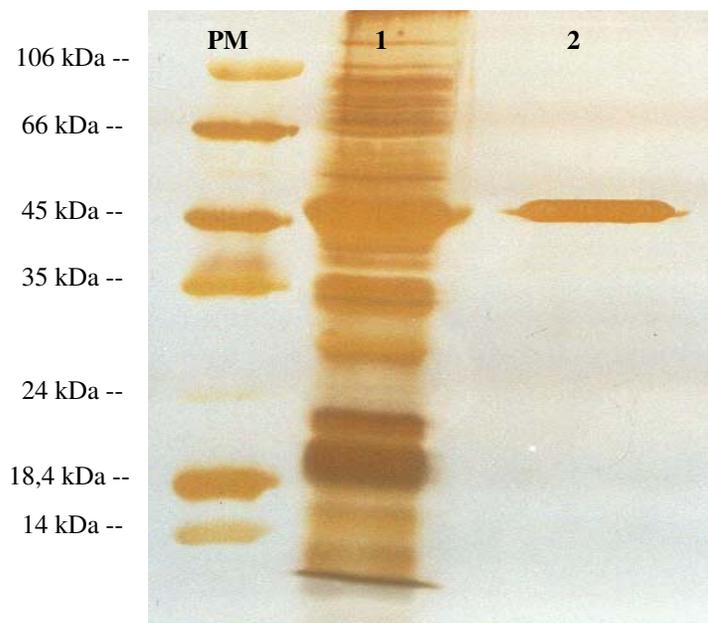


FIGURA 24: EGPA-SDS das diferentes etapas da extração protéica, corado por impregnação pela prata. Legenda: PM - Padrão de Peso Molecular; 1 - Extrato Bruto da cepa induzida (proteínas totais); 2 - Proteína recombinante PFC após purificação em coluna Qiagen Ni-NTA (6xHis).

4.12 - WESTERN BLOTTING:

Para verificar a especificidade do antissoro anti-PFC recém obtido, fizemos ensaios de Western Blotting do extrato bruto contendo a proteína PFC para membranas de nitrocelulose e a estas aplicamos o antissoro anti-PFC, obtido a partir da proteína purificada nas diluições de: 1:100; 1:500; 1:1000 e 1:2000. Como apresentado na FIGURA 25, observa-se o reconhecimento das bandas protéicas que aparecem na altura esperada para a sub-unidade do PFC (46 kDa).

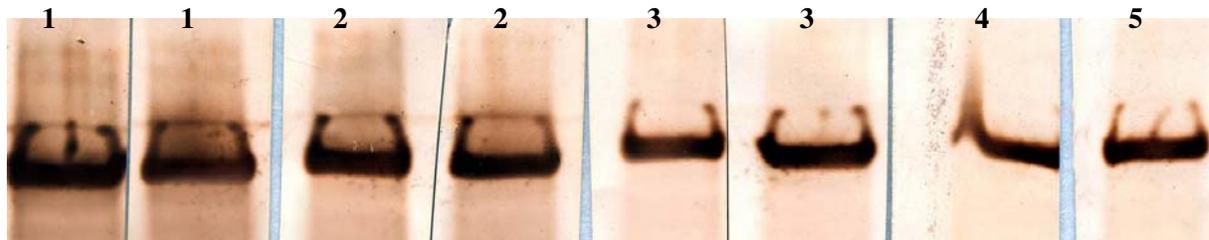


FIGURA 25: Membrana revelada da EGPA-SDS do extrato bruto da proteína PFC. Legenda: 1 – diluição do antissoro anti-PFC 1:100; 2 - diluição do antissoro anti-PFC 1:500; 3 - diluição do antissoro anti-PFC 1:1000; 4 - diluição do antissoro anti-PFC 1:2000.

4.12.1 – WESTERN BLOTTING DA PROTEÍNA PFC FRENTE A DIVERSOS ANTISSOROS

Para efeitos de comparação, fizemos ensaios de transferência da proteína PFC purificada para membranas de nitrocelulose e a estas aplicamos os antissoros: anti-PFC, anti-F4, anti-F41 e anti-CS31A, todos eles obtidos a partir dos antígenos referentes, purificados ou semi purificados.

A FIGURA 26 mostra o resultado desses ensaios, onde utilizamos diluição dos antissoros padronizadas a 1:3000. Nota-se que no caso do F41, a banda protéica do PFC (45 kDa) foi reconhecida pelo antissoro, enquanto no caso do F4 e do CS31A, as bandas observadas foram mais fortes, já frente ao anti-PFC a banda protéica foi intensamente reconhecida.

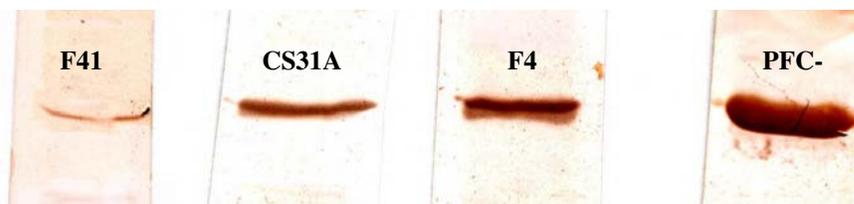


FIGURA 26: Membranas reveladas da EGPA-SDS da proteína PFC purificada. Legenda: F41 - Proteína recombinante PFC exposta a antissoro anti-F41; CS31A - Proteína recombinante PFC exposta a antissoro anti-CS31A; F4 - Proteína recombinante PFC exposta a antissoro anti-F4; PFC - Proteína recombinante PFC exposta a antissoro anti-PFC. O título de cada antissoro é 1:3000.

4.13 – ENSAIOS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA:

Realizamos observações em microscopia eletrônica de transmissão da cepa de campo CG1905-B cultivada em meio Minca a 16°C (FIGURA 27) e a 37°C (FIGURAS 28 e 29). Neste ensaio não utilizamos anticorpos e as preparações foram realizadas utilizando-se fosfotungstato de potássio (PTK) como contrastante. Observamos fímbrias longas e rígidas no cultivo a 37°C, enquanto não houve a expressão de fímbrias quando a cepa foi cultivada a 16°C.

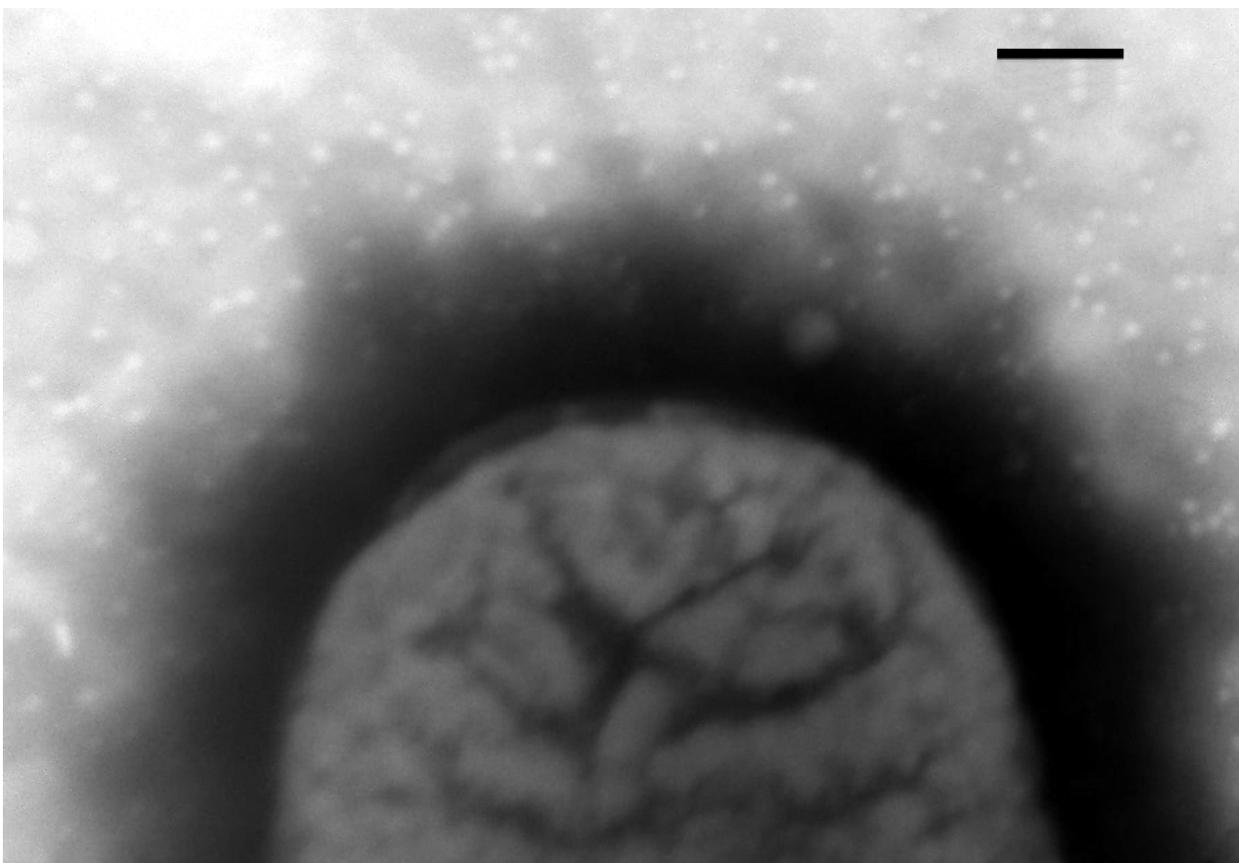


FIGURA 27: Micrografia da cepa CG1905-B de *E.coli* cultivada a 16°C. Aumento final: 138.000x. A barra equivale a 115 nanômetros

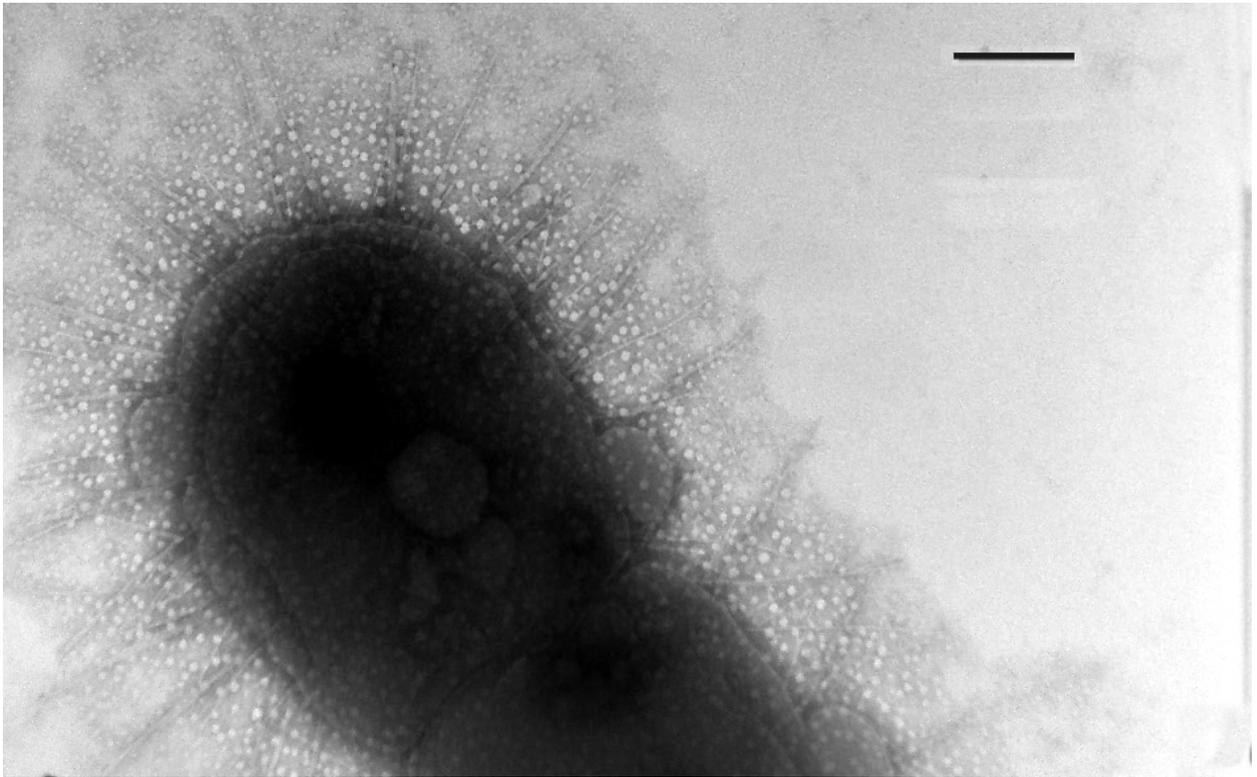


FIGURA 28: Micrografia da cepa CG1905-B de *E.coli* cultivada a 37°C. Aumento final: 58.380x. A barra equivale a 257 nanômetros



FIGURA 29: Micrografia da cepa CG1905-B de *E.coli* cultivada a 37°C. Aumento final: 120.652x. A barra equivale a 66 nanômetros.

4.13.1 – MARCAÇÃO COM OURO COLOIDAL:

Nas preparações utilizando anti-IgG de coelho (Sigma) obtido em cabra, conjugada com ouro coloidal de partículas de 5nm, as bactérias não foram contrastadas, para evitar maior impregnação de material ao redor das células. Observa-se uma extensa área marcada pelo anticorpo conjugado com ouro ao redor da bactéria cultivada a 37°C (FIGURAS 30 e 31), enquanto que naquelas cultivadas a 16°C a marcação é débil.

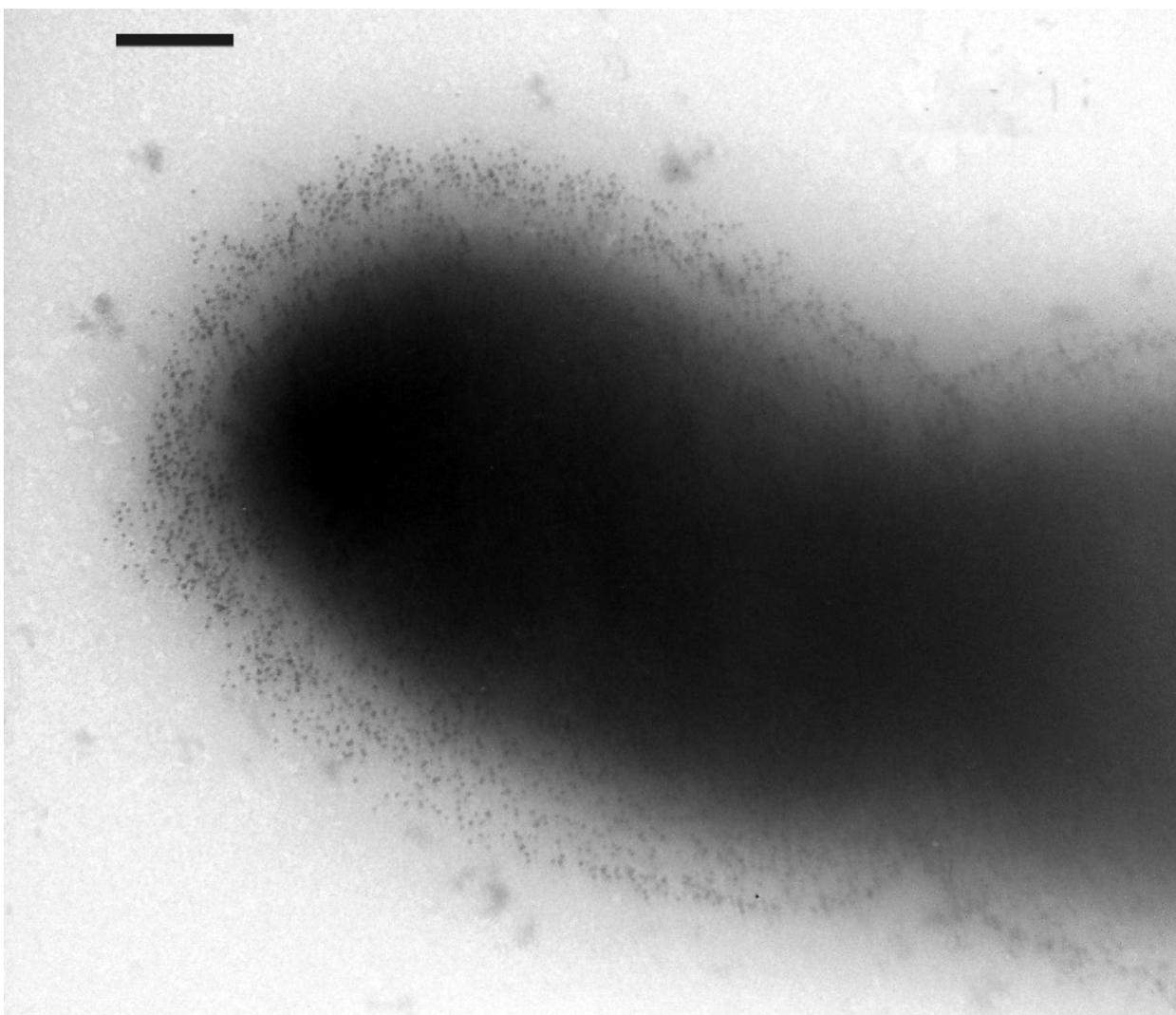


FIGURA 30: Marcação com ouro coloidal da cepa CG1905-B de *E.coli* cultivada a 37°C. Aumento final: 102.000x. A barra equivale a 124 nanômetros.

Na FIGURA 31 apresentamos micrografia da cepa CG1905-B crescida a 16°C, que foi utilizada como reação controle; observa-se que, embora haja presença de partículas de ouro, elas se encontram em menor quantidade e de maneira esparsa, além de estarem presentes por toda a área fotografada, demonstrando que não houve reconhecimento significativo pelo antissoro anti-PFC, das estruturas presentes na cepa cultivada a 16°C.

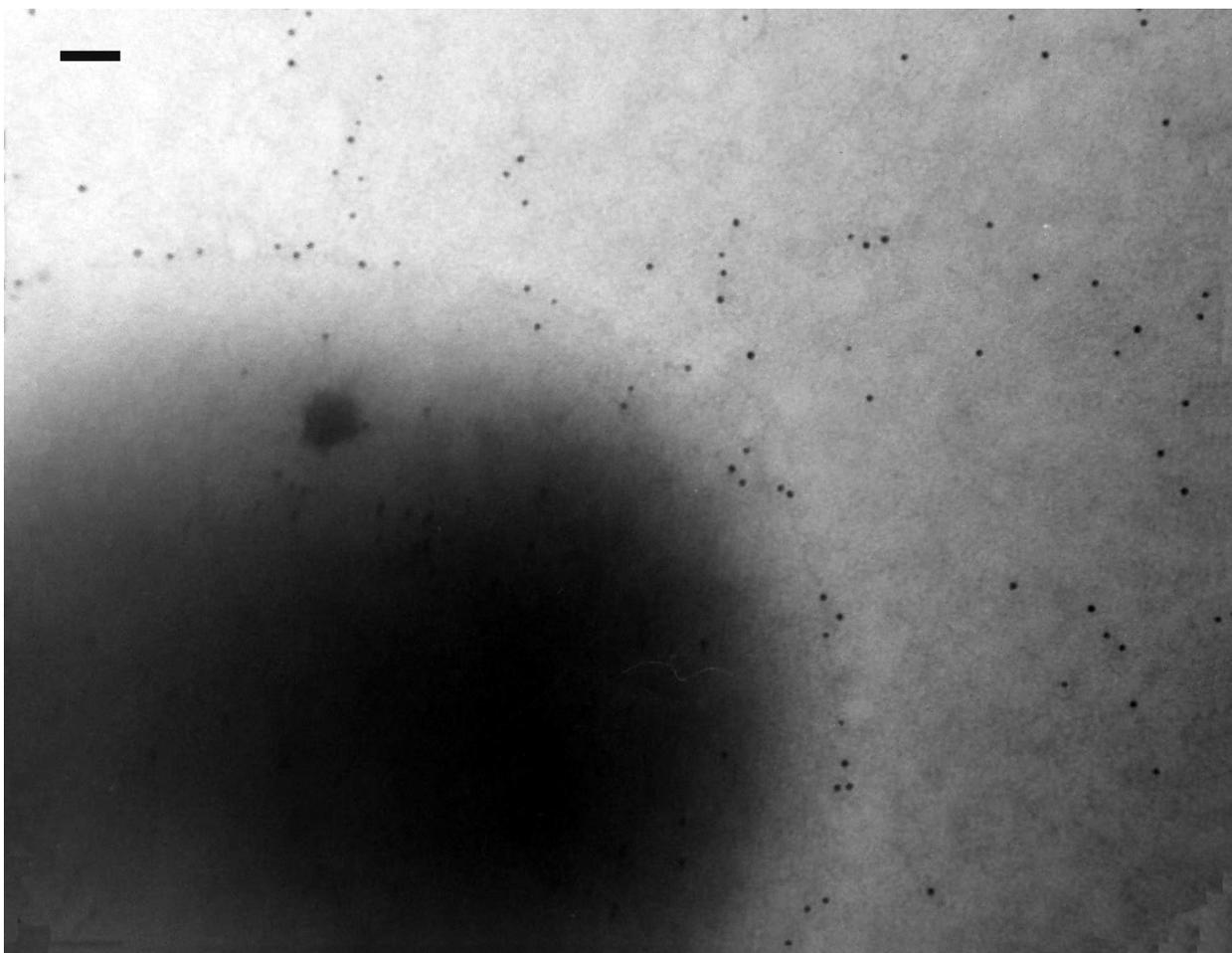


FIGURA 31: Marcação com ouro coloidal da cepa CG1905-B de *E.coli* cultivada a 16°C. Aumento final: 147.250x. A barra equivale a 50 nanômetros

4.14 – ENSAIOS DE PCR PARA DETECÇÃO DA FÍMBRIA DO TIPO 1:

Executamos a detecção da fímbria do tipo 1 nas 35 cepas portadoras do PFC e encontramos o gene para esta fímbria em 30 cepas; naquelas 18 cepas portadoras apenas do PFC, encontramos 16 cepas positivas para a fímbria do tipo 1, como consta no QUADRO 04.

QUADRO 04: FATORES DE VIRULÊNCIA E SOROTIPOS DAS CEPAS DE *E. coli* PFC POSITIVAS

CEPA	SOROTIPO	FATORES DE VIRULÊNCIA	
		Fatores de Colonização	Toxinas
50(3)	O7:H6	F5	-
57(B-1)	O26:H11		-
94(2)	O3:H16	F1, F17	-
111(2)	R:NT	F1	EAST-I, Stx-I
306(C-2)	O3:H16	F1, F17	EAST-I
1162(D-5)	O8:H21	F1, F5	Stx-II
1162(D-7)	NT:NM		EAST-I, Stx-II
1162(D10)	O11:NM	F1	EAST-I, Stx-I
2147(4)	O8:NT	F17	Stx-II
3106(C-4)	NT:H8	F1	ST-I, EAST-I, Stx-II
E57(14) 26	O8:H7	F1	-
E57(15) 10	R:NM	F1	ST-I, ST-II, EAST-I, Stx-II
E57(19) 13	R:H8	F1	-
E57(40)19	O64:H48	F1	-
E57(43)22	O64:H48	F1	-
E57(48)29	O7:H8	F1	ST-I, Stx-II
E57(49)09	O33:H25	F5	Stx-II
E57(50)21	O2:H42	F1	Stx-II
E57(55)33	O146:H21	F17	Stx-II
A 8236	O8:H7	F1, F17, F41	-
B 8236	O153:H8	F1, F17, F41	-
FRC A AM1	O8:H19	F1, F17	EAST-I
FRC B AM1	O153:H8	F1, F17, F165	EAST-I
COX B AM 4	O153:H8	F1, F17, F41	EAST-I
CNPGC A	O153:H8	F1, F165	EAST-I
CG 1898-A	O6:H21	F1, F165	EAST-I, CNF-I, Stx-I
CG 1902-B	O117:H10	F1, F17	Stx-II
CG 1902-C	NT:NT	F1	ST-I, EAST-I, CNF-I, Stx-I
CG 1902-D	O25:NT	F1	CNF-I, Stx-I
CG 1905-B	O25:NT	F1	CNF-I, Stx-I
CNPGC 577(4)	O2:NM	F1	-
CNPGC 1117(2)	R:NM	F1	-
CNPGC 2147(4)	O2:H32	F1, F5	Stx-I, Stx-II
CNPGC 2279(1)	O138:NM	F1, F5	Stx-II
CNPGC 2279(3)	O138:NM	F1	-

Legenda: R – Rugosa; NT - Não tipável; NM – Não móvel.

4.15 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE ADESÃO NAS LINHAGENS CELULARES Caco-2, HeLa, HEp-2 e HT-29:

Realizamos estes ensaios somente com as 18 cepas que apresentaram apenas o gene para o PFC.

Das culturas celulares ensaiadas, apenas na linhagem Caco-2 foi observada adesão, dessa forma serão apresentadas fotografias dos ensaios com esse tipo celular. Esta linhagem apresenta crescimento bastante intenso, formando aglomerados que dificultam a visualização de células isoladas.

Primeiramente apresentamos fotografias dos padrões de adesão utilizados como parâmetro para nossas comparações sendo as Figuras 32A e 32B e 33A e 33B referentes aos padrões de Adesão Difusa (AD), Localizada (AL), Agregativa (AAG) e controle negativo (DH5 α) respectivamente.

Em seguida, apresentamos os resultados observados com a adesão da cepa de campo CG-1905-B e da inibição da adesão dessa mesma cepa quando utilizamos diferentes diluições do antissoro anti-PFC. Não observamos diferença entre os tratamentos propostos, dessa forma estamos apresentando as imagens referentes ao tratamento 1 nas páginas 79 e 80.

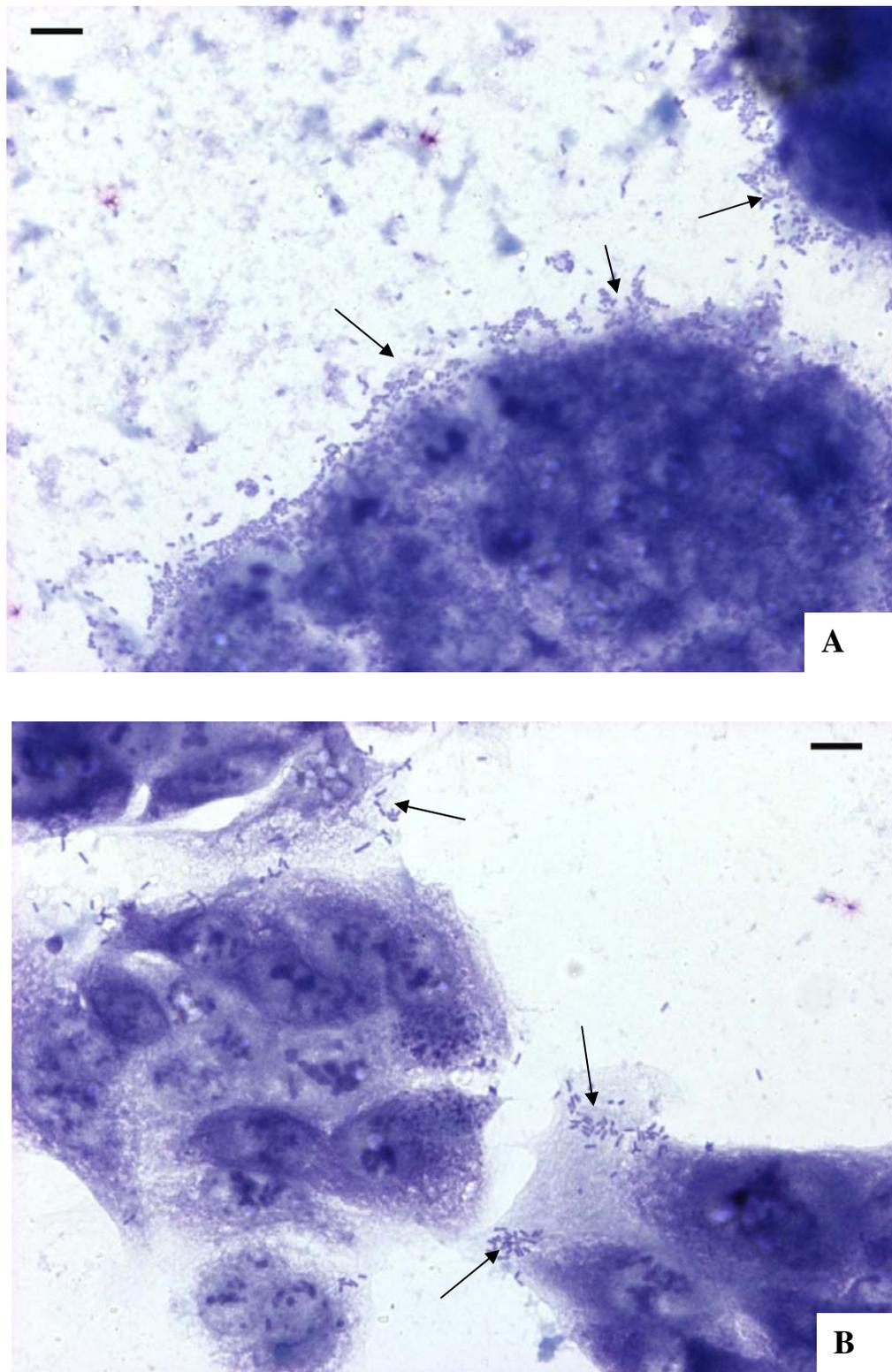


FIGURA 32: Padrões de adesão a células Caco-2. **A:** *E.coli* O8 TR 302/4 – DAEC (Adesão Difusa). As setas indicam bactérias aderidas. **B:** *E.coli* E348/69 – EPEC (Adesão Localizada). As setas indicam os “grumos” ou “clusters” de bactérias. Aumento Final nas fotografias: 400x. As barras equivalem a 17,5 micrômetros.

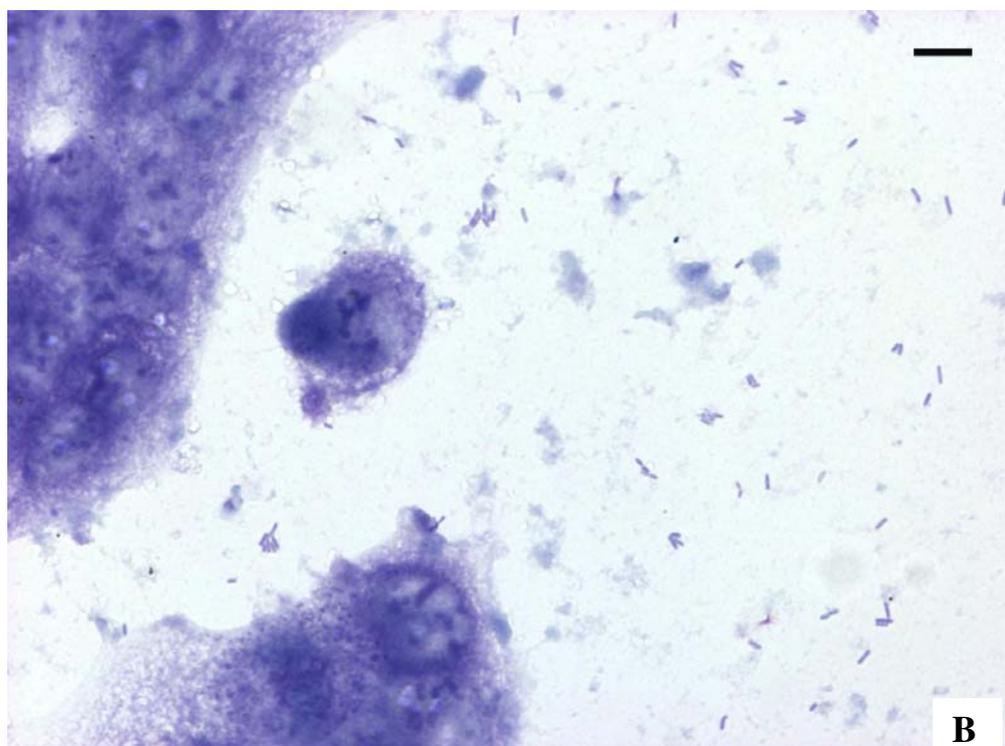
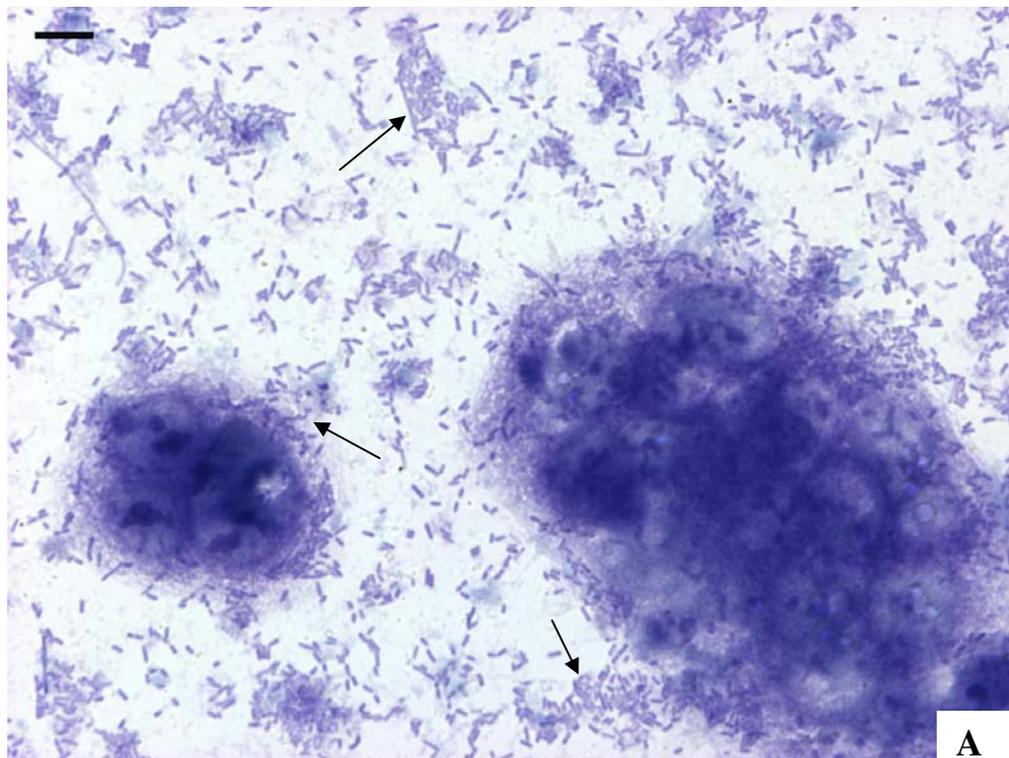


FIGURA 33: Padrões de adesão a células Caco-2. **A:** *E.coli* O431-1 – EAEC (Adesão Agregativa). As setas indicam os “agregados” de bactérias aderidas a células e entre si. **B:** *E.coli* DH5 α (controle negativo). Aumento Final nas fotografias: 400x. As barras equivalem a 17,5 micrômetros.

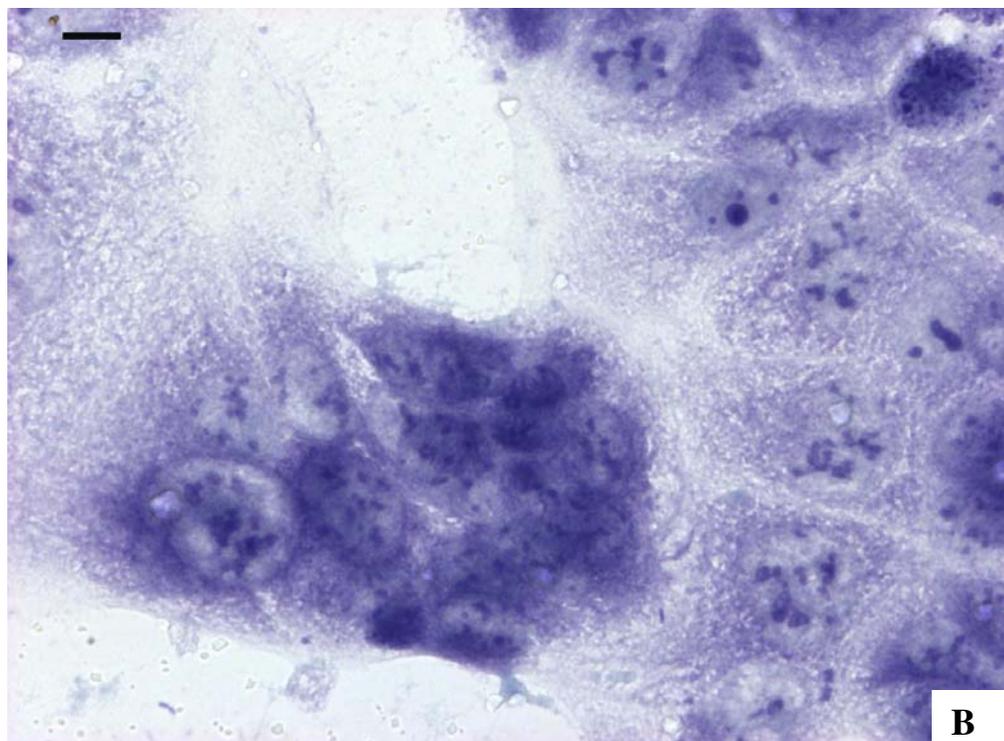
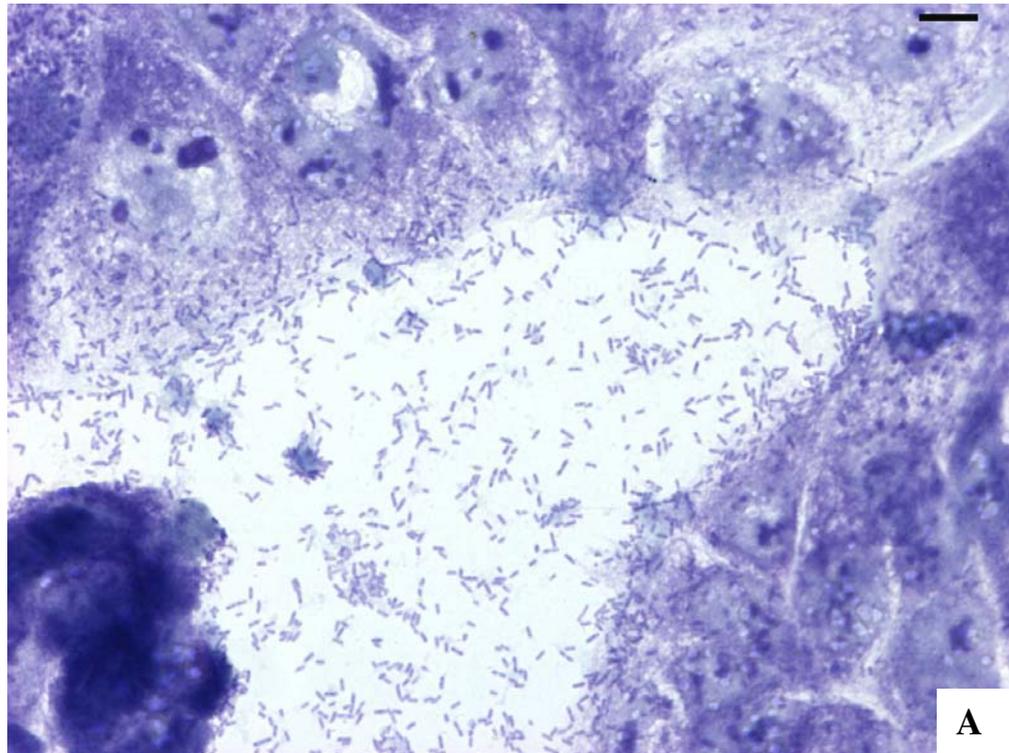


FIGURA 34: Padrões de adesão a células Caco-2. **A:** *E.coli* CG-1905-B. **B:** *E.coli* DH5 α (controle negativo). Aumento Final nas fotografias: 400x. As barras equivalem a 17,5 micrômetros.

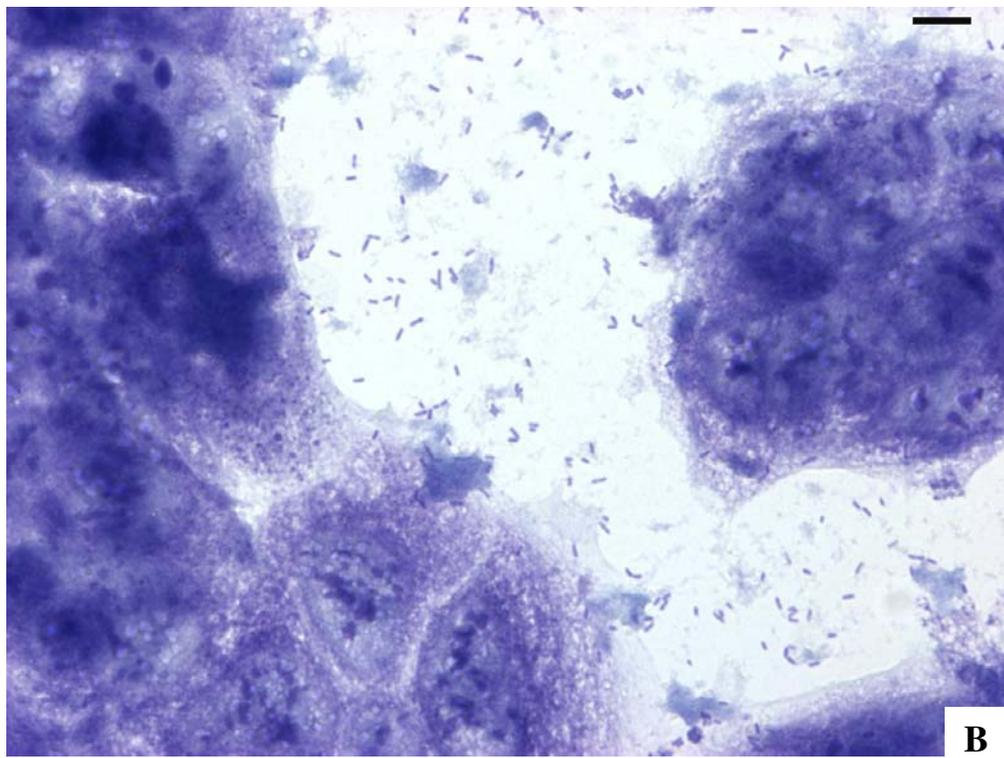
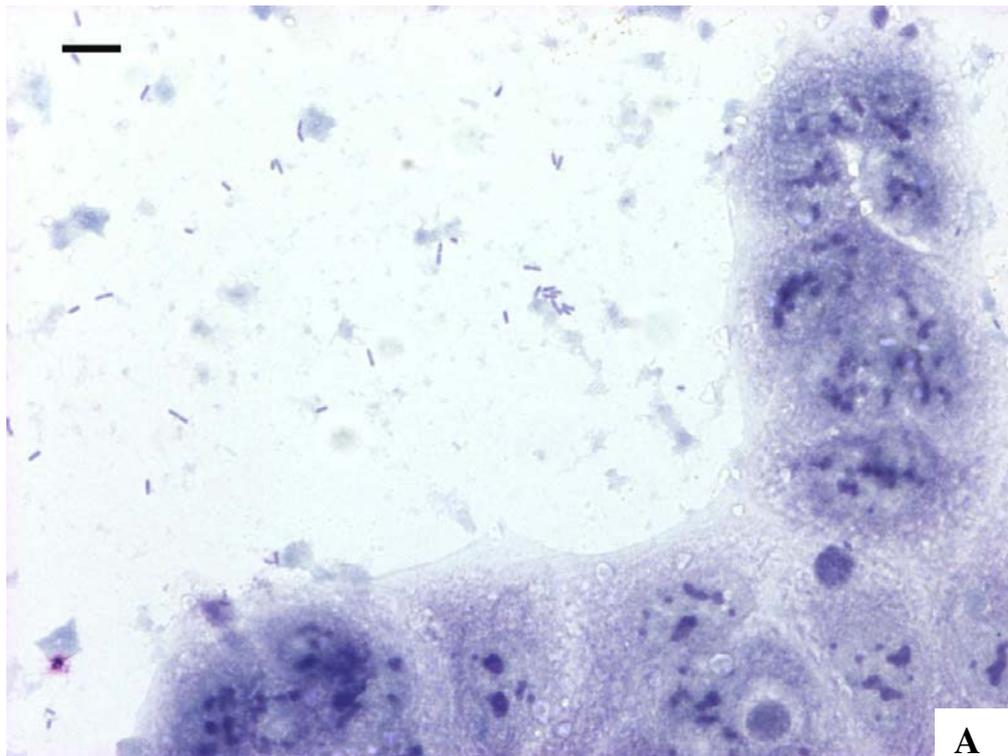


FIGURA 35: Experimento de inibição de adesão da cepa CG-1905-B de a células Caco-2. **A:** incubação com antissoro anti-PFC diluído 1:15. **B:** incubação com antissoro anti-PFC diluído 1:30. Aumento Final nas fotografias: 400x. As barras equivalem a 17,5 micrômetros.

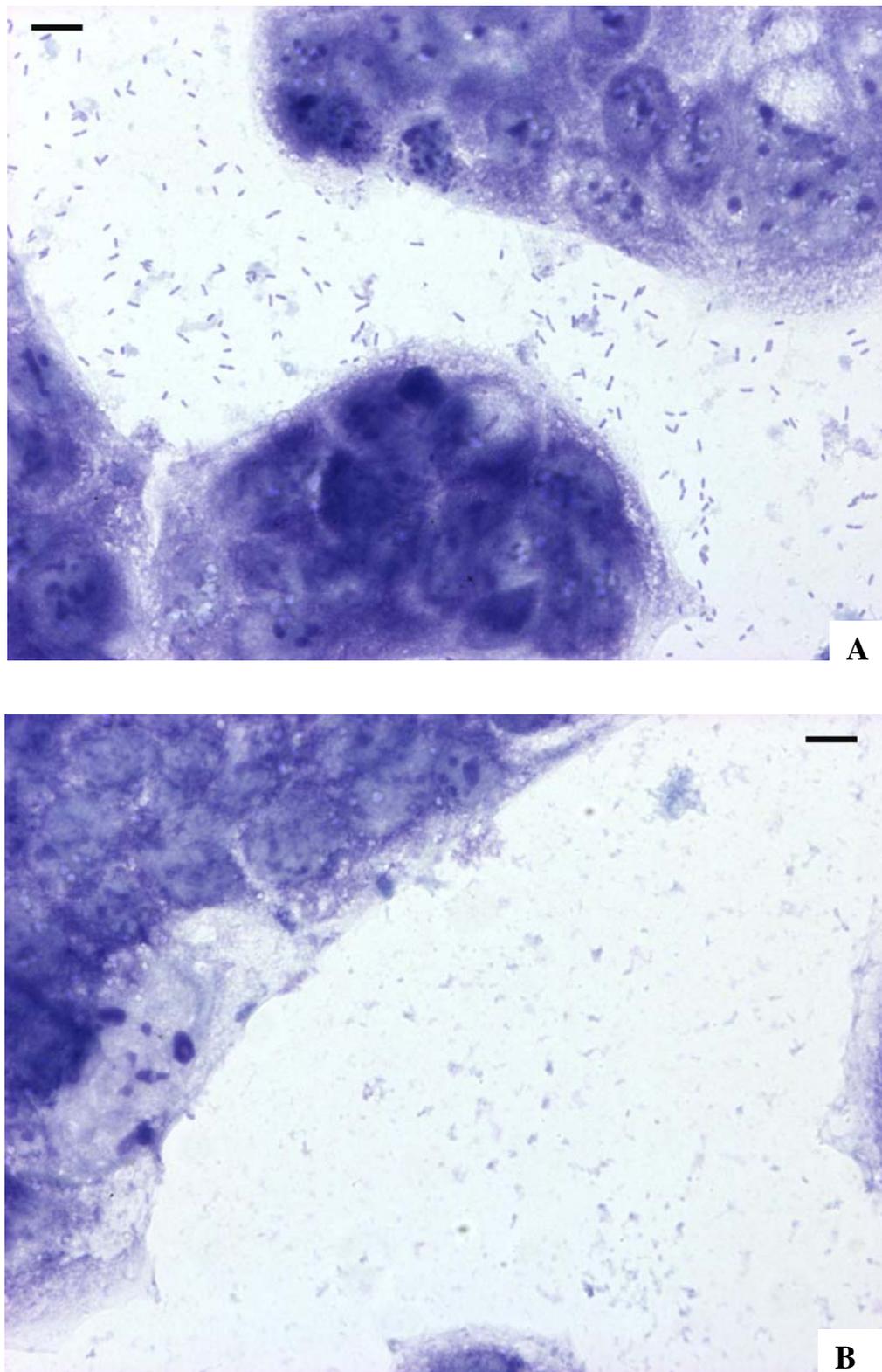


FIGURA 36: Experimento de inibição de adesão da cepa CG-1905-B de *E.coli* a células Caco-2. **A** incubação com antissoro anti-PFC diluído 1:60. **B**: Controle negativo, foi adicionado apenas antissoro diluído 1:15. Aumento Final nas fotografias: 400x. As barras equivalem a 17,5 micrômetros.

4.16 – ESTUDOS DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA PFC:

Utilizamos o programa PSIPRED para prever a estrutura secundária da proteína PFC e compará-la com as proteínas FaeG, ClpG e FimF41.

O programa utilizado oferece uma interface gráfica bastante ilustrativa. Para as outras proteínas, apresentamos os resultados sob forma de texto (FIGURAS 37, 38 e 39).

Nessas figuras é possível reconhecer pelas cores: as hélices, representadas em pela letra **H** em VERDE, as folhas tipo beta (β -sheets) pela letra **E** em amarelo, as alças (loops ou coils) pela letra **C** em PRETO; utilizamos essas cores e letras pois são esses os critérios adotados pelos autores do programa quando oferecem os resultados que apresentamos para a proteína PFC na FIGURA 40.

Proteína PFC						
Pos:	10	20	30	40	50	60
Conf:	914775688998751002000001432650784727754776784258842752113302					
Pred:	CHHHHHHHHHHHHHHCCHEEECCCCCCCEEEECCCECCCCCCCCEEEECCCCCCCCCE					
AA:	MKKTLIALAVAASAVSGMAHAWTNGDFNGSVDIGGSITADDYRQKWSWAVGSDINGFSNA					
Pos:	70	80	90	100	110	120
Conf:	232037874688740688228997216650025443567532378705677357852768					
Pred:	EEEECCCCCEEEEECCCCEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCEEEEECCCC					
AA:	LTDLTDGGTKLTITVSGNKPILLGKTTEAFAAPVDAGVGAKPQITFTDYEGQKVALQYEH					
Pos:	130	140	150	160	170	180
Conf:	87687589998888988369999983014454311037865210212765214642325					
Pred:	CCCCCEEEEEEEEECCCCEEEEEEEEEEEEEEEECCCCCCCCCECCCCCEEEEECCCC					
AA:	NNKDGLGYFVLPKNTDGTKIGSLKANVAYAGAASVGKDGQGYIGSLSERDWSIFKGGGLG					
Pos:	190	200	210	220	230	240
Conf:	555445424230024665516732422045420000046644212223165322110454					
Pred:	CCCCCCCCCCCCHHHHHHHHCCCHHHHCCCCCHHHHCCCCCCCCCCCCEEEEEEEECCCC					
AA:	AYGSASVLDGGDAAAERTALFGSLSQARDASTDSSPKMQEFPVLTARTGSIGENMKYTDG					
Pos:	250	260	270	280		
Conf:	133432223331142289982777664245444104788759					
Pred:	CHHHHHHHHHHHHCCCEEEEECCCCCCCEEEEEEEEEEEEEEEC					
AA:	TVVSTXYAMGIANGQTIETFDQAVTASTQWSAPLNVAVTYN					

FIGURA 37: Resultado da previsão da estrutura secundária da Proteína PFC de *E.coli*.

Legenda: Conf: Nível de confiança (0=baixa, 9=alta); Pred: Estrutura Secundária Prevista (H=hélice, E= folha do tipo beta, C=alça); AA: Sequência de aminoácidos; Pos: Posição relativa do aminoácido na cadeia.

Alinhamos as previsões da proteína PFC e da proteína FaeG para verificarmos se havia coincidências dos tipos de estrutura (hélice, folha e alça) destas proteínas, conforme a FIGURA 41. Quando comparadas as estruturas secundárias do PFC do FaeG, foi observado um índice de homologia de 74,2%, reforçando os resultados anteriores, que relacionam essas duas proteínas na mesma família.

Pos:	10	20	30	40	50
PFC	C H H H H H H H H H	H H H H H C C H H E	E E C C C C C C C E	E E E C C E E C C C	C C C C C E E E E E
FaeG	C H H H H H H H H H	H H H H H H H H H H	H C C C C C C C C E	E E E C E E E C C C	C C C C C E E E E E
Pos:	60	70	80	90	100
PFC	C C C C C C C C E E	E E E E C C C C C E	E E E E E C C C C E	E E E E E C C C C C	C C C C C C C C C C
FaeG	C C C C C C C C E E	H H H H C C C C C E	E E E E E C C C C E	E E E E C C C C E	E E E C C C C C C C
Pos:	110	120	130	140	150
PFC	C C E E E E E C C C	C C E E E E C C C C	C C C C C E E E E E	E E E E C C C C E	E E E E E E E E E E
FaeG	C C E E E E E C C C	C C E E E E E C C C	C C C C C C C E E E	E E E E E E C C C C	C E E E E E E E E E
Pos:	160	170	180	190	200
PFC	E E E E E E E C C C	C C C C E E E C C C	C C E E E E E C C C	C C C C C C C C C C	C C H H H H H H H H
FaeG	E E E E E E E E C C	C C C C C C C C E	E E C C C C C E E E	E C C C C C C C C C	C C C H H H H H H H
Pos:	210	220	230	240	250
PFC	C C C H H H H C C C	C C H H H H C C C C	C C C C C C C C E E	E E E E E E C C C C	C H H H H H H H H H
FaeG	H H C C C C C H H H	H H H H H H H H C C	C C C C E E E E E E	E E C C C C C C C C	C C H H H H H H H H
Pos:	260	270	280		
PFC	H H C C C E E E E E	E C C C C C C C E E	E E E E E E E E E E	E C .	
FaeG	H H H H C C C C C C	C C C C C C C C E	E E E E E C C E E E	E E C	

FIGURA 41: Resultado do alinhamento entre as previsões da estrutura secundária das Proteínas PFC e FaeG(F4) de *E.coli*. Legenda: Estrutura Secundária Prevista (H=hélice, E= folha do tipo beta, C=alça); em vermelho aparecem as estruturas que são homólogas nas duas seqüências; Pos: Posição relativa do aminoácido na cadeia.

Discussão

5 - DISCUSSÃO:

Vários estudos têm sido realizados para determinar a distribuição de fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* de origem animal isoladas em áreas geográficas diferentes. Sabe-se que a colonização das mucosas é um pré-requisito para a virulência e assume-se que a maioria dos isolados clínicos de *E. coli* expressa uma ou mais adesinas. Assim, a identificação e caracterização de novas adesinas são importantes, não apenas para estender o conhecimento a respeito destas organelas, mas, também, para o eventual desenvolvimento de vacinas (SUSSMAN, 1997).

Uma vez que a colibacilose é considerada uma importante causa de perdas econômicas, o estudo dos fatores de virulência expressos por amostras de *E. coli* isoladas em animais de interesse econômico é necessário.

Esse estudo originou-se quando determinamos a presença do fator de colonização CS31A em 255 cepas de *E. coli* isoladas de casos de colibacilose neonatal bovina (VALADARES, 2000). Neste estudo foi realizada a detecção fenotípica do CS31A utilizando antissoro anti-CS31A, e em 96 cepas positivas verificamos sua associação, através de PCR, a outros fatores de virulência comumente relacionados com doenças entéricas em bovinos (fatores de colonização, citotoxinas e enterotoxinas). Nos ensaios para detecção do CS31A por PCR, onde utilizamos nossos próprios iniciadores, bem como as seqüências sugeridas por BERTIN *et al.* (1998), os resultados obtidos com os dois pares de iniciadores foram inesperados e revelaram que das 96 cepas, 41 não amplificavam o gene para o CS31A, o que nos permitiu formular a hipótese de que existiria um fator de colonização que apresentava semelhanças antigênicas com o CS31A, mas que seria suficientemente diferente deste, a ponto de não possuir as regiões detectadas por ambos os conjuntos de iniciadores na PCR.

Com base nessa hipótese, procuramos identificar este possível novo fator de colonização detectado nestas cepas e, para tanto, propusemos uma estratégia para a detecção desse fator usando iniciadores baseados em homologias com outros fatores de colonização relacionados.

Para testar a hipótese de que o fator em estudo apresenta similaridades com a família F4, F41 e CS31A, uma vez que observamos reação positiva do antissoro anti-

CS31A frente às cepas em estudo, utilizamos uma estratégia baseada nos estudos de GIRARDEAU *et al.* (1991) e KORTH *et al.* (1992), que, apoiados nas semelhanças que os genes acessórios (*faeF*, *clpF*, *faeH* e *clpH*) têm em comum, conseguiram obter estruturas perfeitamente funcionais ao alterar o operon que codifica as fímbrias F4 e CS31A, inserindo no lugar do gene que codifica a subunidade principal da fímbria o gene que codifica a respectiva subunidade de outra fímbria da mesma família (F4, F41 e CS31A).

Assim propusemos amplificar a subunidade principal do PFC utilizando as informações dos genes acessórios do F4 e do CS31A. A síntese de quatro iniciadores de cada lado dos genes para a subunidade principal possibilitou que fossem testadas dezesseis diferentes combinações de iniciadores, onde esperávamos que alguma delas fosse positiva na confirmação da nossa hipótese e todos os iniciadores foram desenhados para anelar aproximadamente na mesma temperatura. Como conhecíamos as distâncias entre os pontos de anelamento, baseados no operon *fae* do F4, pudemos estimar os tamanhos dos produtos amplificados em cada reação de PCR e utilizamos cepas F4+ como controle nas reações (F4ab, F4ac e F4ad).

Em todos os experimentos os tamanhos obtidos foram compatíveis com os esperados na teoria, uma vez que o programa ImageMaster faz uma comparação entre a migração das bandas atribuídas como padrão e as bandas de interesse, determinando assim o seu peso molecular. Em todas as três cepas padrão, os produtos amplificados têm tamanhos bastante próximos, embora para o CS31A e para o F41 não se conheçam os espaços entre os genes, diferentemente do operon *fae* do F4, que serviu como modelo para estimar os tamanhos desses genes, indicando que os operons desses fatores apresentam estrutura semelhante.

Devemos ressaltar que alguns dos resultados apresentados são diferentes do que esperávamos, tais como o aparecimento de muitas bandas inespecíficas em algumas das reações e o não aparecimento das bandas de interesse ou bandas muito tênues em reações que envolviam algumas das combinações. Acreditamos que isso se deva a ajustes de alguns parâmetros nas reações, pois o objetivo inicial era determinar o conjunto de iniciadores que utilizassem o mesmo protocolo de reação para amplificar e como os resultados obtidos referem-se a reações que aconteceram ao mesmo tempo

e sob as mesmas condições, acreditamos que isso deva explicar tais diferenças, sobretudo no caso da cepa de *E. coli* F4+, onde algumas reações não amplificaram.

Também encontramos os mesmos problemas nas reações envolvendo a linhagem padrão para o CS31A (FIGURAS 09 E 10), pois esperávamos que todas as reações fossem positivas na referida temperatura.

No caso do F41, como não estão descritas as seqüências dos genes correspondentes aos genes *faeF* e *clpF*, *faeH* e *clpH*, não podemos aplicar o mesmo raciocínio que aplicamos para o não aparecimento de bandas nos experimentos com F4 e com CS31A, ou seja, como sendo devido apenas a um ajuste na temperatura de anelamento nas reações, tendo em vista a presença das bandas inespecíficas. Houve reação, mas o não aparecimento na altura esperada (ao redor de 1500 pb) nos permite concluir que os iniciadores não encontraram região homóloga no operon F41.

O fato de obtermos seqüências no estudo da cepa padrão para o F41, mesmo sem existir na literatura descrição para os genes acessórios (que seriam equivalentes aos genes *F* e *H* dos operons do F4 e CS31A), reforça ainda mais a teoria de que existe homologia entre estes fatores de colonização tanto na subunidade principal quanto nos outros genes que compõem o operon, como afirmaram GIRARDEAU *et al.* (1991) e KORTH *et al.* (1991).

A reação que combinava os iniciadores P4 e P5, ocorreu satisfatoriamente e era a reação mais interessante para os primeiros ensaios de seqüenciamento desse fragmento, porque desta combinação resulta o produto amplificado de menor tamanho entre todos, ao redor de 1450 pares de base. Posteriormente, quando utilizamos o termociclador com gradiente de temperatura, pudemos padronizar as reações de PCR e eliminar as bandas inespecíficas nas reações com os iniciadores P4 e P5 pela elevação da temperatura de anelamento de 58°C, que era a temperatura obtida no desenho dos iniciadores pelo programa Primer Design, para a temperatura de 63°C, na qual observamos apenas o aparecimento da banda de interesse. Assim procedemos para o estudo da presença do gene para o PFC nas cepas de campo.

Procuramos também determinar a localização dos genes para o PFC no genoma bacteriano, se cromossômico ou plasmidial, e não encontramos um perfil plasmidial que

pudesse agrupá-las, pois algumas delas não apresentaram plasmídios e são positivas para o PFC. Concluímos assim que o PFC é de origem cromossômica, contudo a presença desses genes em plasmídios não pode ser descartada.

Quando esses resultados foram comparados com os descritos na literatura, verificamos que existe uma série de divergências, pois o F4 (K88) e o CS31A são de origem plasmidial (GIRARDEAU *et al.* 1988), enquanto o F41 é de origem cromossômica (SMYTH *et al.* 1994). Ainda assim outros ensaios devem ser realizados a fim de confirmar nossa dedução.

Quando realizamos os ensaios de PCR para verificar a presença do PFC, observamos que 35 das 41 cepas se mostraram positivas para o gene e 20 delas não apresentavam outros fatores de colonização associados. Esperávamos que todas as 41 cepas apresentassem reação positiva, uma vez que a característica que agrupou estas cepas foi justamente a presença de reação positiva na soroaglutinação em lâmina quando confrontadas com antissoro anti-CS31A, mas que não apresentaram resultados positivos em PCR para esse mesmo fator.

Considerando a amostragem de 255 cepas envolvidas no nosso estudo anterior, verificamos que essas 35 cepas PFC+ correspondem a 13,72% do total de cepas inicialmente envolvidas no estudo. É importante mencionar que naquela ocasião foram 47 cepas confirmadas como CS31A+ ou 18,43% do total inicial, nove (19,14%) foram associadas a F17, cinco (10,63%) F5+, duas (4,25%) F165+, quatro (8,51%) foram F5+ e F17+ enquanto 27 (57,44%) foram positivas apenas para o CS31A.

Na presente amostragem, o fator de colonização mais freqüente foi o F17, detectado em nove cepas, esse fator é freqüentemente associado a *E. coli* enterotoxigênicas e septicêmicas de origem bovina (Le BOUGUÉNEC & BERTIN, 1999).

Os FCs F5 (K99) e o F41, bastante relacionados a cepas ETEC (BLANCO *et al.* 1992) foram encontrados em seis e três cepas, respectivamente. O fator de colonização F165 que é freqüentemente relatado em cepas de *E. coli* isoladas de leitões e bezerros com septicemia e/ou diarreia (FAIRBROTHER *et al.* 1986) também foi encontrado em três cepas do presente estudo. Em nenhuma das cepas foi encontrado o gene para a intimina (*eae* - enterocyte adherence factor).

Paralelamente, executamos também estudos de microhemaglutinação manose sensível (MHMS), para detecção da fímbria do tipo 1 e os resultados obtidos não indicaram a presença fenotípica dessa fímbria (dados não apresentados). Contudo, após os primeiros resultados dos ensaios de microscopia eletrônica, resolvemos, em 18 cepas, realizar a detecção dos genes para a Fímbria do tipo 1. Neste ensaio encontramos 16 cepas positivas para esta fímbria. Concluímos então que os ensaios de MHMS não deveriam ser considerados, por apresentarem resultados duvidosos.

Observa-se também uma alta incidência de cepas toxigênicas, 23 no total, sendo as citotoxinas do tipo Shiga (Stx) as mais freqüentes: 12 portadoras do gene para Stx-II, sete portadoras do gene para Stx-I, e uma possui os genes para ambas as citotoxinas.

Além de Stx, verificamos a presença de quatro cepas positiva para a enterotoxina termo-estável do tipo 1 (ST-I), 1 para ST-II e não foram encontradas cepas positivas para a enterotoxina termo-lábil do tipo 2 (LT-II), enterotoxinas estas características de ETEC; 12 das cepas foram positivas para a enterotoxina termo-estável de *E. coli* enteroagregativa do tipo 1 (EAST-I), contudo, o papel desta enterotoxina na patogenia das *E. coli* ainda não está claro (BERTIN *et al.* 1998).

Encontramos também cinco cepas portadoras de genes para o Fator Necrosante Citotóxico (CNF) do tipo 1, que é um fator bastante relacionado à septicemia em bovinos. (BERTIN *et al.* 1998).

A presença dessa variedade de toxinas pode ser um indicativo da importância do PFC na patogenia de *E. coli* em bovinos e também do papel dos bovinos como reservatório de amostras de *E. coli* produtoras de toxina do tipo Shiga (STEC), que são potencialmente nocivas a seres humanos (SUSMMAN, 1997).

Para conhecer definitivamente a seqüência do gene que codifica a subunidade principal do PFC, os produtos da PCR foram seqüenciados no Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS); as cepas CG-1902-D e CG-1905-B, apresentaram bons resultados de seqüenciamento que, quando devidamente processados, foram comparados com as seqüências descritas na literatura para o F4, F41 e CS31A e entre si, utilizando o programa Blast.

Verificamos inicialmente que existe homologia com a região final dos genes *faeF*

e *clpF* e com a região inicial dos genes *faeH* e *clpH*, de acordo com a previsão inicial do modelo. Sendo assim os resultados demonstraram que ambas as cepas seqüenciadas possuem o gene para o PFC e a região central do gene é diferente dos genes homólogos das subunidades principais dos fatores em estudo.

Utilizamos o programa Bioedit para traduzir a seqüência do gene em aminoácidos e assim obtivemos a provável seqüência da proteína PFC. Esses dados foram reunidos e submetidos ao GENBANK e atualmente se encontram disponíveis para consulta pública sob o código de acesso **AY462136** (ANEXO C).

Quando utilizamos o programa para comparar as seqüências de aminoácidos obtidas nos ensaios da cepa de campo CG 1905-B com as seqüências do F4, F41 e CS31A e da Fímbria do Tipo 1 para que pudéssemos inferir as relações de parentesco da família do F4 e, dessa forma, determinar a extensão da homologia entre elas, observamos que a cepa de campo tem semelhanças com diversas regiões das proteínas FaeG, ClpG, FimF41 (FIGURAS 17, 18 e 19). Optamos por apresentar comparações entre as seqüências de aminoácidos, ao invés dos nucleotídeos, pois acreditamos que seriam mais práticas dado o tamanho das seqüências a serem mostradas e igualmente esclarecedoras, pois permitem a visualização das regiões de homologia.

Quanto à proteína da subunidade principal, existe grande homologia com as regiões iniciais do FaeG (os primeiros 86 aminoácidos), ClpG (os primeiros 30 aminoácidos) e FimF41 (os primeiros 17 aminoácidos) – FIGURA 17. Verificamos que o PFC apresentou maior homologia com a subunidade principal do F4 (49,7%), contudo existe uma região que vai da posição 87 até a posição 240, que apresenta muito pouca homologia com estes fatores de colonização e com nenhuma outra seqüência relevante disponível no GenBank, o que nos indica que esta região é exclusiva do PFC.

Além disso, o fato de haver essa região onde não há homologia com o F4, F41 e CS31A pode explicar os resultados que motivaram este estudo, visto que os iniciadores utilizados apresentam homologia com regiões entre os aminoácidos 90 e 240, que são diferentes entre o PFC e o CS31A.

Tendo em vista esses estudos prévios, nossa hipótese inicial era de que o PFC

seria mais próximo do CS31A, mas nossas análises demonstraram que o PFC apresenta mais homologia ao F4.

Além da posição 240, observamos homologia com os finais das proteínas ClpG e FaeG, sendo mais extensa a homologia com esse último; não encontramos homologia significativa da proteína PFC com a porção terminal da proteína FimF41.

Todos esses dados foram reunidos e alinhamentos múltiplos foram obtidos utilizando-se o programa CLUSTALW e, com base nesses alinhamentos, foi construída uma matriz de similaridade entre essas proteínas, e também foi preparada uma árvore filogenética com o programa Mega, utilizando-se o método de *neighbour-joining* com correção de Poisson. Os ramos das árvores foram testados por *bootstrap*, que determina a probabilidade de determinado ramo estar correto dentre o número de repetições escolhido (KUMAR *et al.* 2004).

A filogenia obtida representa uma síntese dos resultados obtidos anteriormente: as homologias entre o PFC, o F4 e o CS31A são mais evidentes no início e no fim da cadeia polipeptídica, sobretudo quando comparamos a proteína PFC com FaeG; no caso do F41 não se observou qualquer homologia na porção terminal, indicando um parentesco um pouco mais distante entre este e o PFC, o que de fato foi observado.

A região inicial compreende os primeiros 21 aminoácidos e é comum a todas as proteínas da família do F4 (K88), é denominada peptídeo sinal, que serve para o reconhecimento da subunidade principal pelas proteínas acessórias que irão transportá-las e montá-las na superfície bacteriana. Em geral essas proteínas são chamadas pré-pilinas, sendo que ao ser montada, sofre clivagem, passando a ser apenas pilina (GIRARDEAU *et al.* 1991). Dessa forma é compreensível que essas regiões sejam homólogas em todas essas proteínas e que as diferenças observadas nas regiões internas das seqüências propiciaram a diversidade de receptores e de morfologia das fímbrias quando comparadas entre si.

De posse de fragmentos amplificados de DNA contendo o gene completo da subunidade principal do PFC, passamos a uma nova etapa dos estudos onde visando a clonagem e posterior expressão do gene PFC.

O gene foi inserido em um vetor de expressão, para que a síntese protéica ocorresse em altos níveis. Adotamos o Kit Champion pET-151 TOPO de clonagem direcional e transformação das linhagens de *E.coli* TOP10 e BL21 Star [DE3] que, segundo o fabricante, garante que o produto de PCR é inserido no vetor de maneira correta, ou seja, com o códon de iniciação da cadeia polipeptídica (ATG) imediatamente após o sítio de acoplamento da RNA polimerase. Para isso foi necessária a síntese dos iniciadores descritos no item 3.9.2. O plasmídeo continha um gene de resistência a ampicilina para facilitar a seleção das bactérias transformadas. Além disso, a proteína resultante apresentava uma "cauda" composta por 6 resíduos de Histidina (6xHis Tag) que foi utilizada como ligante na cromatografia de afinidade, facilitando a purificação e como forma de detecção indireta da proteína alvo, através do uso de anticorpos contra o 6xHis-Tag. Por outro lado, a proteína recombinante passou a ter um tamanho maior que a proteína original, com o acréscimo de 17,6 kDa no seu peso molecular.

Depois das etapas de cultivo, indução e extração da proteína recombinante, verificamos que a banda correspondente à proteína purificada tem um peso molecular de aproximadamente 46 kDa, que é resultado da cauda de histidina (17,6 kDa) mais a proteína PFC propriamente dita, que tem aproximadamente 29 kDa e segundo o programa PROTPARAM, o peso molecular estimado foi de 29,2 kDa, sendo próximo aos pesos das subunidades principais dos outros FC em estudo.

Quando realizamos os ensaios de transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose, verificamos o total reconhecimento da proteína PFC pelo antissoro obtido, como foi visto na FIGURA 25. Com a proteína purificada, também fizemos um experimento comparando o reconhecimento desta por antissoros contra os FCs F4, F41 e CS31A, previamente produzidos em nosso laboratório e obtidos da imunização de coelhos com os antígenos purificados ou semi purificados,

Os resultados observados (FIGURAS 25 e 26) sugerem que anticorpos contra diferentes epítomos desses FCs foram produzidos, daí o reconhecimento da proteína PFC por esses antissoros. Acreditamos que o reconhecimento da proteína PFC purificada pelos diferentes antissoros (F4 F41 e CS31A) foi facilitado devido ao fato da proteína se encontrar de maneira isolada e purificada, ter sido submetida a tratamento

prévio e ter sido denaturada durante o processo de eletroforese, além da concentração dos antissoros (1:300) ser relativamente elevada.

Neste sentido, MOSELEY *et al.* (1986), descreveram a reação cruzada que era observada quando sonda para detectar o gene referente ao F4 era utilizada em cepas F41 positivas, sugerindo que devem existir novos tipos de adesinas relacionados com o F4 e F41, já que algumas cepas reagem com as sondas para o F4 e para o F41, apresentavam atividade hemaglutinante, mas não produziam o F4 nem o F41.

Em 1988, GIRARDEAU *et al.* quando descrevem o CS31A, relataram que do antissoro anti-CS31A obtido utilizando a proteína purificada e, de certa forma também denaturada, foi capaz de reconhecer o F4, mas não o F41 e que o antissoro anti-F4 que utilizaram não era capaz de reconhecer o CS31A e nem o F41; já em 1991, GIRARDEAU *et al.* fazem extensas comparações entre os genes do CS31A, F4 e F41 e afirmaram tratar-se de uma família de adesinas que possuem certo grau de homologia na seqüência de seus genes, mas que são diferentes imunologicamente.

Estes resultados são um pouco diferentes dos nossos, pois observamos, em maior ou menor grau, reação positiva dos antissoros F4, F41 e CS31A frente à proteína PFC. Cabe salientar que o fato da proteína PFC ser efetivamente reconhecida pelos antissoros específicos para os outros fatores de colonização em estudo, comprova nossos estudos anteriores que relacionaram, inicialmente de maneira teórica, nossa proteína PFC como sendo integrante da família de fatores de colonização a que pertencem o F4, o F41 e o CS31A.

Nos ensaios de microscopia eletrônica de transmissão (M.E.T.) observamos que as bactérias apresentavam fímbrias longas e não aquela estrutura tipo-capsular do CS31A, como descrito por GIRARDEAU *et al.* (1988), lembrando muito mais a estrutura de fímbrias rígidas. As FIGURAS 28 e 29 representam a amostra CG1905-B cultivada em placas de meio Minca incubadas a 16°C. Nota-se a completa ausência de fímbrias na superfície bacteriana, já as FIGURAS 30 e 31, mostram fímbrias bastante longas nas bactérias cultivadas a 37°C.

Durante análise das fotografias, o Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, do Depto de Histologia e Embriologia do I.B. da Unicamp chamou a atenção para o fato de estar observando mais de um tipo de estrutura fimbrial na superfície das bactérias: algumas

fímbrias mais grossas e longas e algumas, menores e mais finas que, em alguns locais apresentavam-se reunidas, formando uma espécie de “tufo”. Fizemos então reação de PCR para verificar a presença dos genes da fímbria do tipo 1 nas 35 cepas PFC+ que, de antemão, acreditávamos não ser portadoras de nenhum outro FC, e nem que tratasse da fímbria do tipo 1, pois os resultados com os ensaios de MHMR realizados anteriormente, não indicavam a presença dessa fímbria. Foi então que verificamos que essas cepas são portadoras da Fímbria do tipo 1 (dados não apresentados) e assim, aquelas fímbrias longas que observamos nas primeiras preparações deveriam ser a fímbria do tipo 1, contudo, prováveis fímbrias menores (fibrilas) enquadram-se no perfil descrito para as fímbrias da família do F4 (SMYTH *et al.* 1994).

Na FIGURA 30, apresentamos uma ampliação de uma micrografia onde é possível verificar a presença de fímbrias mais longas e fímbrias menores.

Para a realização dos ensaios de M.E.T. com anticorpos conjugados com ouro coloidal, alteramos o protocolo para preparação das grades de microscopia eletrônica de modo a não contrastar algumas das preparações, procurando evitar que ficasse mais difícil a observação e o reconhecimento dos locais onde poderia estar ligado o anticorpo conjugado com ouro. Assim, nas FIGURAS 31 e 32, na preparação das bactérias não foi utilizado contrastante (ácido fosfotúngstico) e são visíveis ao redor das bactérias várias partículas de ouro, demonstrando que o anticorpo primário foi capaz de reconhecer estruturas presentes naquelas regiões; a distância entre os locais de onde se observam as partículas de ouro e o corpo bacteriano, confirmam nossa hipótese de que as fímbrias menores (fibrilas) e não as fímbrias mais longas são as estruturas do PFC, sendo assim semelhantes às fibrilas observadas por SCALETSKY *et al.* (2005) no operon *Ida* de EPEC atípica.

Anda no mesmo experimento, como observado na FIGURA 31, observamos uma extensa área ao redor da bactéria marcada pelo anticorpo que foi absorvido com a cepa homóloga CG1905-B cultivada a 16°C e com a linhagem ORN115, padrão para Fímbria do tipo 1, cultivada a 37°C. Na FIGURA 32, apresentamos micrografia da cepa CG1905-B cultivada a 16°C, que foi utilizada como controle. Observa-se que, embora haja presença de partículas de ouro, elas se encontram em menor quantidade e de maneira esparsa, além de estarem presentes por toda a área fotografada,

demonstrando que não houve reconhecimento significativo das estruturas presentes na célula crescida a 16°C pelo antissoro anti-PFC, enquanto que nas células crescidas a 37°C foi possível observar a presença de partículas ao redor das bactérias.

Desde os primeiros ensaios com o FC CS31A, os autores tiveram muitas dúvidas quanto à capacidade deste em promover hemaglutinação e adesão das bactérias CS31A⁺ a células epiteliais em cultura, já que nos mesmos estudos em que estabeleceu que o CS31A não era capaz de promover hemaglutinação, KORTH *et al.*, 1991, afirmaram que o CS31A promoveu adesão a culturas de células epiteliais Henle 407 (intestinais humanas) e Caco-2 (células de carcinoma intestinal humano), em um padrão considerado por eles como “difuso”. Para verificarmos se as cepas portadoras do PFC eram capazes de promover adesão, utilizamos vários tipos celulares neste ensaio: células Caco-2, HeLa, Hep-2 e HT-29. Os resultados revelam que ocorre adesão das cepas PFC⁺ apenas em células Caco-2, e de uma maneira por nós considerada como agregativa ou pouco difusa.

Paralelamente, fizemos um ensaio onde buscávamos inibir a adesão da cepa CG-1905-B às células Caco-2, utilizando diferentes diluições do antissoro anti-PFC. E os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, pois verificamos, nas diferentes diluições, uma significativa diminuição da presença de bactérias nas preparações, sobretudo na diluição 1:15, FIGURA 36. Escolhemos apresentar os resultados dos ensaios com essa cepa apenas, pois foi com ela que fizemos os experimentos de clonagem e seqüenciamento do gene PFC e também os ensaios de microscopia eletrônica.

A habilidade de promover adesão pode trazer ao PFC uma maior importância na patogenia dos bezerros com diarreia, apesar das células Caco-2, mesmo sendo células do epitélio intestinal, serem células de origem humana. Dessa forma estudos posteriores devem ser realizados para uma melhor avaliação dessa habilidade.

Com os resultados dos ensaios de sorotipagem verificamos uma grande variedade de marcadores associados ao PFC. Para seguir a nomenclatura adotada pela literatura (McCONNELL *et al.* 1989; HEUZENROEDER *et al.* 1990; VIBOUD *et al.* 1993), decidimos chamar o Possível Novo Fator de Colonização de F CO25, já que uma das cepas (CG-1902D) que foi seqüenciada e apresenta o sorotipo O25:NT. A outra

cepa (CG-1905-B) que foi utilizada para diversos estudos neste trabalho não pode ser tipada com os antissoros disponíveis até o momento, sendo classificada como NT:H7.

Com base na seqüência de aminoácidos deduzida a partir do seqüenciamento do gene PFC, conduzimos um outro estudo teórico baseado em recursos de bioinformática que faz previsões da estrutura secundária de proteínas, com base na composição de aminoácidos desta, utilizando para tanto o Programa PSIPRED.

Esse programa atribui valores crescentes (de 0 a 9) para cada aminoácido posicionado, chamando esses valores de valor de confiança (McGUFFIN *et al.* 2000). Notamos que em nossa seqüência, na FIGURA 39, aparecem vários valores baixos, ou seja, pouco confiáveis segundo o método utilizado pelo programa, por isso resolvemos fazer a mesma previsão para as proteínas FaeG e ClpG, cujas seqüências foram determinadas por outros autores e depositadas no Genbank, e obtivemos também diversos valores baixos, como pode ser observado nas FIGURAS 39 e 40.

Como já foi apresentado, o percentual de homologia entre a seqüência de aminoácidos das proteínas FC O25 e FaeG é de 49,7%. Quando comparadas apenas as estruturas, este índice subiu para 74,2%, demonstrando que, mesmo sendo uma previsão, os resultados anteriormente obtidos foram novamente confirmados: a proteína FC O25 apresenta muita semelhança com a proteína FaeG do F4.

Vale lembrar que esses tipos de estudos vêm se aperfeiçoando no decorrer do tempo, mas, de maneira alguma, são capazes de substituir os complexos ensaios de cristalização de proteínas para estudar sua estrutura através de difração por raios-X; torna-se então necessário esse tipo de análise, uma vez que as proteínas FaeG do F4 e ClpG do CS31A ainda não foram alvo de estudos cristalográficos.

Uma perspectiva para estudos futuros se concentra na elucidação completa da estrutura do operon do FC O25, e sua clonagem em uma linhagem K-12 de *Escherichia coli*, para que estudos da morfologia do FC O25 em microscopia eletrônica e maiores comparações com outros fatores de colonização possam ser realizados, tendo em vista as lacunas existentes na literatura no que se refere à estrutura completa do CS31A e principalmente do F41, que foi descrito há tanto tempo e do qual se conhece apenas a seqüência do gene da sua proteína principal (ANDERSON & MOSELEY, 1988).

A emergência de novos fatores de colonização que sejam suficientemente

distintos antigenicamente daqueles cobertos pelas vacinas e que podem ser capazes de preencher os nichos que acabam sendo deixado por estes. A inclusão destes “novos” fatores nas formulações vacinais pode prevenir a possível evasão imune que acaba por tornar ineficazes as estratégias de vacinação. As vacinas fimbriais comercialmente disponíveis contra infecções por *E. coli* em animais têm sido utilizadas extensivamente e, aparentemente, não tem ocorrido emergência de FCs de baixa prevalência. Contudo, como não existe abordagem direta a respeito, pode ser que os eventuais aumentos na frequência destes FCs ainda não estejam sendo notados (SVENNERHOLM & HOLMGREN, 1997).

Uma vez que estamos diante de um novo fator de colonização, encontrado em 13,72% do total de cepas estudadas, que está associado a cepas toxigênicas que podem afetar o desempenho da pecuária bovina e servir como reservatório para causar doenças em seres humanos, sugerimos que estudos mais abrangentes, envolvendo uma maior amostragem de animais e que representem adequadamente as diferenças de raça e finalidade de manejo sejam realizados para determinar a prevalência e, sobretudo identificar os fatores de virulência associados à patogenia da doença no país. Estes estudos possibilitariam entender melhor a etiopatologia da colibacilose e também forneceriam o suporte científico necessário à produção de vacinas mais eficientes para atender às necessidades da pecuária de gado de leite e de corte.

Conclusões

6 - CONCLUSÕES:

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que:

1) O FC O25 é um fato de colonização isolado de *Escherichia coli* de casos de colibacilose neonatal bovina, que é membro da família dos FC F4, CS31A e F41, cuja proteína principal tem um peso molecular estimado em 29,5 kDA e apresenta 49,7% de homologia com o F4, 35,4% com o CS31A e 29,4% com o F41.

2) Esse fator apresenta-se como fibrilas ao redor das células, de maneira semelhante ao F4 e os que nossos estudos indicam, é de origem cromossômica.

3) Os estudos em cultura de célula revelaram que esse fator promove adesão do tipo agregativa a células de carcinoma de cólon humano Caco-2 e que essa adesão é inibida pelo tratamento com o antissoro anti-FCO25.

4) Nas cepas FC O25+ encontramos associação com outros fatores de colonização e sobretudo com toxinas relacionadas com a patogenia em bovinos, evidenciando novas relações entre mecanismos de virulência.

5) O FC O25 encontra-se presente em cepas de *E. coli* no Brasil e, dado sua frequência detectada nos isolados estudados (13,72%), pode ser um fator importante na patogenia da *E. coli* no rebanho bovino brasileiro.

Referências Bibliográficas

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADAMS, L.M. *et al.* Identification and characterization of a K88 and CS31A like operon of a rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* strain which encodes fimbriae involved in the colonization of rabbit intestine. **Infect Immun**, v. 65, p. 5222-5230, 1997.

ANDERSON, D.G.; MOSELEY, S.L. *Escherichia coli* F41 adhesin: genetic organization, nucleotide sequence, and homology with the K88 determinant. **J Bacteriol**, v. 170(10), p. 4890–4896, 1988.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Citação de texto**: NBR-10520. São Paulo, 2002.

_____. **Referências**: elaboração: NBR-6023. São Paulo, 2002.

_____. **Trabalhos acadêmicos**: NBR-14724. São Paulo, 2001.

BERG, R.D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends in Microbiol**, v. 4, n. 11, p. 430-435, 1996.

BERTIN, Y. *et al.* Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST-I toxin among CNF-1 producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. **FEMS Microbiol Lett**, v. 162, p. 235-239, 1998.

BETTELHEIM, K.A. In: GYLES, C.L. ***Escherichia coli* in domestic animals and humans**. CAB International, cap. 1, p. 3-9, 1994.

BIELASZEWSKA, M. *et al.* Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. **Infect Immun**, 72: 1812-1816, 2004.

BIOEDIT v. 5.0.9.1 disponível em www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html acessado em 15/03/2003.

BLANCO, J.; BLANCO, M. ***Escherichia coli* enterotoxigenicos, necrotoxigenicos y verotoxigenicos, de origen humano y bovino; patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico.** In: Servicio publicaciones diputacion provincial. Lugo, Espanha, 1993.

BLANCO, J. *et al.* Serogroups of *Escherichia coli* strains producing necrotizing factors CNF1 and CNF2. **FEMS Microbiol Lett**, v. 96, p. 155-160, 1992.

BLANCO, J.E. *et al.* O serogroups, biotypes and *eae* genes in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy rabbits. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 3101-3107, 1996a

BLANCO, M. *et al.* Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). **J Microb Meth**, v. 26, p. 95-101, 1996b

BLANCO, M. *et al.* Detection of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction (PCR); comparison with results obtained using phenotypic methods. **J Microb Meth**, v. 31, p. 37-43, 1997.

BLAST disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> e acessado em 10/09/2002 e 14/03/2003.

BORER, P.N.; DENGLER, B.; TINOCO, I., Jr. Stability of ribonucleic acid and double-stranded helices **J Mol Biol**, v. 86, p. 843-853, 1974.

CHANTER, N.; HALL, G.A.; BLAND, A.P. Dysentery in calves caused by an atypical strain of *Escherichia coli* (S102-9). **Vet Microbiol**, v. 12, p. 241-253, 1986.

CLUSTAW disponível em <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/clustalw.htm> e consultado em 10/09/2002 e 14/03/2003.

CONTREPOIS, M. *et al.* Septicemic *Escherichia coli* and experimental infection of calves. **Vet Microbiol**, v. 12, p. 109-118, 1986.

CONTREPOIS, M. et al. Prevalence of CS31A and F165 surface antigens in *Escherichia coli* isolates from animals in France, Canada and India. **FEMS Microbiol Lett**, v. 59, p. 319-324, 1989.

Dean, A. G. et al. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. **J. Infect. Dis**, v. 125, p. 407-411, 1972.

De RYCKE, J. et al. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. **Vet Res**, v. 30(2-3), p. 221-233, 1999.

De RYCKE, J; OSWALD, E. Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation. **FEMS Microbiol Lett**, v. 203, p. 141-148, 2001.

DI MARTINO, P. et al. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. **Infect Immun**, v. 63, p. 4336-4344, 1995.

DONNENBERG, M.S.; KAPER, J. B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 60, p. 3953-3961, 1992.

DUBREIL, J.D. *Escherichia coli* STb enterotoxin. **Microbiology**, v. 143, p. 1783-1795, 1997.

DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R. Relevance of *Escherichia coli* O157:H7 to the dairy industry. **Dairy, Food Environ Sanit**, v. 14, p. 656-660, 1994.

ELWELL, C. et al. *Escherichia coli* CdtB mediates cytolethal distending toxin cell cycle arrest. **Infect Immun**, v. 69, n; 5, p. 3418-3422, 2001.

ESPINASSE, J. et al. A new diarrhoeic syndrome with ataxia in young Charolais calves: clinical and microbiological studies. **Vet Rec**, v. 128, p. 422-425, 1991.

FAIRBROTHER, J.M.; LARIVIÈRE, S.; LALLIER, R. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. **Infect Immun**, v. 51, p. 10-15, 1986.

FASANO, A. *et al.* Enterotoxin and cytotoxin production by enteroinvasive *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 58, p. 3717-3723, 1990.

GANNON, V.P.J.; GYLES, C.L. Characteristics of the Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease. **Vet Microbiol**, v. 24, p. 89-100, 1990.

GENBANK disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/> acessado em 10/05/2001, 04/09/2002, 19/03/2003 e 25/10/2003.

GILMORE, M.S.; FERRETTI, J.J. The Thin Line Between Gut Commensal and Pathogen. **Science**, v. 299, p. 1999-2002, 2003.

GIRARDEAU, J.P. *et al.* Sequence analysis of the *clpG* gene, which codes for surface antigen CS31A subunit: Evidence of an evolutionary relationship between CS31A, K88 and F41 subunit genes. **J Bacteriol**, v. 173, p. 7673-7683, 1991.

GIRARDEAU, J.P. *et al.* CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. **Infect Immun**, v 56, p. 2180-2188, 1988.

GUINÉE, P.A.M.; VELTKAMP, J. e JANSEN, W.H. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v 15, p. 676-678, 1977.

GUINÉE. P.A.M.; JANSEN, W.H.; AGTERBERG, C.M. Preparation of specific *Escherichia coli* K88 antisera by means of purified K88ab and K88ad antigens. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg I Abt Orig A**, v. 248, p. 182-189, 1980.

GYLES, C.L. *Escherichia coli*. In: GYLES, C.L.; THOEN, C.O. (eds.) **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. The Iowa State University Press. p 114-131, 1986.

GYLES. C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Can J Microbiol**, v. 38, p. 734-746, 1992.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl Acids Symp Ser**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem**, v. 48, p. 422-426, 1972.

HEUZENROEDER, M. W. *et al.* A new fimbrial type (PCFO9) on enterotoxigenic *Escherichia coli* O9:H2LT1 isolated from a case of infant diarrhea in Central Australia. **FEMS Microbiol Lett**, v. 66, p. 55-60, 1990.

HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS. **Hoefer Electrophoresis Catalogs and Exercises**. 1991.

HOLLAND, R. E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. **Clin Microbiol Rev**, v. 3, p. 345-375, 1990.

HUYS, G. *et al.* *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, p. 807-810, 2003.

IMAGEMASTER Total Lab. Versão 1.11. Amersham Pharmacia Biotech. 2000.

INNIS, M.A. *et al.* **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press. EUA. 1990.

ISAACSON, R.E.; NAGY, B.; MOON, H.W. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: colonization and adhesion factors of pig enteropathogenic that lack K88. **J Infect Dis**, v. 135, p. 531-539, 1977.

JALLAT, C. *et al.* Self-transmissible R plasmids encoding CS31A among human *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal stools. **Infect Immun**, V. 62, p. 2865-2873, 1994.

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

KAPER, J.B. EPEC delivers the goods. **Trends in Microbiol**, v. 6, n. 5, p. 169-172, 1998.

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

KORTH, M.J. *et al.* Functional expression of heterologous fimbrial subunits mediated by the F41, K88, and CS31A determinants of *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 60, p. 2500-2505, 1991.

KORTH, M.J.; LARA, J.C.; MOSELEY, S.L. Epithelial cell invasion by bovine septicemic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 62, p. 41-47, 1994.

KRESSE, A.U.; ROHDE, M.; GUZMÁN, C.A. The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. **Infect Immun**, v. 67, p. 4834-4842, 1999.

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

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.

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

Le BOUGUÉNEC, C.; BERTIN, Y. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *E. coli* strains in domestic animals. **Vet Res**, v. 30, p. 317-342, 1999.

LEDERBERG, J. *E. coli* K-12. **Microbiol Today**. v. 31, p. 116, 2004.

LINTERMANS, P.F. *et al.* Characterization and purification of F17 adhesin on the surface of bovine enteropathogenic and septicemic *Escherichia coli*. **Am J Vet Res**, v. 49, p. 1794-1799, 1988.

MAINIL, J.G. *et al.* Comparison of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from farm animals and from humans. **Vet Microbiol**, v. 70, p. 123-135, 1999.

MEGA v. 2.1 disponível em www.megasoftware.net, acessado em 15/03/2003
McCONNELL, M. M. *et al.* Characterization of a putative colonization factor (PCFO166) of enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroup O166. **J Gen Microbiol**, v. 135, p. 1135–1144, 1989.

McGUFFIN, L.J.; BRYSON, K.; JONES, D.T. The PSIPRED protein structure prediction Server. **Bioinformatics**, v 16, p 404-405, 2000.

MOLENDÁ, J.R. *Escherichia coli* (Including O157:H7): An environmental health perspective. **Dairy, Food Environ Sanit**, v. 14, p. 742-747, 1994.

MOL, O.; OUDEGA, B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 19, p. 25-52, 1996.

MORRIS, J.A.; STEVENS, A.E.; SOJKA, W.J. Anionic and cationic components of the K99 surface antigen from *Escherichia coli* B41. **J Gen Microbiol**, v. 107, p. 173-175, 1978.

MOSELEY, S.L. *et al.* Cloning of chromosomal DNA encoding the F41 adhesin of ETEC and genetic homology between adhesins F41 and K88. **J Bacteriol**, v. 167, p. 799-804, 1986.

NAGY, B., FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. **Vet Res**, v. 30(2-3), p. 259-284, 1999.

NATARO, J.P. *et al.* Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 48:378-383, 1985.

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

OAKLEY, B.R.; KIRSH, D.D.; MORRIS, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Anal Biochem**, v. 105, p. 361-363, 1980.

OKUDA, J., FUKUMOTO, M., TAKEDA, Y., NISHIBUCHI, M. Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: suckling mouse response to the products of the *cdtABC* genes of *Shigella dysenteriae*. **Infect Immun**, 65: 428-433, 1997.

ØRSKOV, F. *et al.* The establishment of K99, a thermolabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. **Acta Pathol Microbiol Scand Sect B**, v. 83, p. 31-36, 1975.

ØRSKOV, I. *et al.* Simultaneous occurrence of *Escherichia coli* B and antigens in strains from diseased swine. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 53, p. 404-422, 1961.

PRIMER DESIGN disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3> www.cgi e acessado em 15/05/2001 e 07/06/2003.

PSIPRED disponível em <http://globin.bio.warwick.ac.uk/psipred> e acessado em 09/01/2004.

REED, G.H., Foodborne illness (part 8) *Escherichia coli*. **Dairy Food Environ Sanit**, v. 14, p. 329-330, 1994.

SALYERS, A.A., WHITT, D.D. **Bacterial pathogenesis, a molecular approach**. ASB Press. 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Lab Press. cap 6, p. 6.12, 1989.

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

SCALETSKY, I.C.A. *et al.* Isolation and characterization of the localized adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 56, p. 2979-2983, 1988.

SCALETSKY, I.C.A. *et al.* Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesin found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 73, p. 4753-4765, 2005.

SEARS, C.L.; KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol Rev**, v. 60, p. 167-215, 1996.

SHIMIZU, M. *et al.* Incidence and some characteristics of fimbriae FY and 31A of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Japan. **Microbiol Immunol**, v. 31, p. 417-426, 1987.

SHIPLEY, P.L. *et al.* Identification and cloning of the genetic determinant that encodes for the K88ac adherence antigen. **J Bacteriol**, v. 145(2), p. 920-925, 1981.

SMYTH, C.J.; MARRON, M.; SMITH, S.G.J. In: GYLES, C.L. (ed) **Escherichia coli in domestic animals and humans**. CAB International, cap. 16, p. 402, 1994.

STATENS SERUM INSTITUT .**The International Escherichia and Klebsiella Centre** - WHO -, Copenhagen, Dinamarca. www.ssi.dk consultado em 17/08/2005.

SUSSMAN, M. *E.coli* and human disease. In: **Escherichia coli: Mechanisms of Virulence** edit. Max Sussman. Cambridge University Press. cap. 1, p. 4, 1997.

SVENNERHOLM, A.M.; HOLMGREN, J. In: SUSSMAN, M. (ed) **Escherichia coli: Mechanisms of Virulence**. Cambridge University Press. cap. 21, p.605-626, 1997.

STIRM, S. *et al.* Episome-carried Surface Antigen K88 of *Escherichia coli* III. Morphology. **J Bacteriol**, v. 93(2), p. 740-748, 1967.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nuc Ac Res**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

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

TÓTH, I. *et al.* Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (Type IV). **J Clin Microbiol**, v X, p. 4285-4291, 2003.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VALADARES, G.F. 2000. Detecção do fator de colonização CS31A em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia e sua associação com outros fatores de virulência. 2000. 81f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular – área de Microbiologia). Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2000.

Van den BROECK, W. *et al.* The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. **Vet Microbiol**, v. 71, p. 223-244, 2000.

Van SOOLINGEN, D. *et al.* Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strains differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 1987-1995, 1993.

VIBOUD, G. I.; BINSZTEIN, N.; SVENNERHOLM, A.M. A new fimbrial putative colonization factor, PCFO20, in human enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 61. p. 5190–5197, 1993.

WRAY, C.; WOODWARD, M.J. *E.coli* infections in farm animals. In: Sussman, M. (ed) ***Escherichia coli* Mechanisms of virulence**. Cambridge University Press, cap 3, p. 56, 1997.

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

YANO, T. *et al.* A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. **Microbiol Immunol**, v. 30, p. 495-508, 1986.

Anexos



COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA - CIBio
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Ofic. CIBio 09/03

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
10 de Setembro de 2003.

Prof. Dr. TOMOMASA YANO

Chefe do Departamento de Microbiologia e imunologia
 Instituto de Biologia
 UNICAMP

Prezado Professor:

Informamos que o projeto envolvendo OGM do tipo I abaixo relacionado, sob responsabilidade do Prof. Dr. DOMINGOS DA SILVA LEITE, foi aprovado pela CIBio-IB/UNICAMP em 10 de Setembro de 2003, para ser desenvolvido nas dependências do Departamento de Genética e Evolução desta Unidade.

No. Projeto (Data da aprovação)	Data de recepção	Nome do Projeto	Prazo para envio de relatório à CIBio
CIBio 2003/03 (10/09/2003)	08/2003	Caracterização de um Possível Novo Fator de Colonização Expresso por Amostras de Escherichia coli Isoladas de Casos de Colibacilose Neonatal Bovina	07/09/2004

Atenciosamente,

Prof. Dra. **SHIRLEI MARIA RECCO-PIMENTEL**
 Presidente da CIBio/IB/UNICAMP



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 719-1, sobre "CARACTERIZAÇÃO DE UM POSSÍVEL NOVO FATOR DE COLONIZAÇÃO EXPRESSO POR AMOSTRAS DE ESCHERICHIA COLI ISOLADAS DE CASOS DE COLIBACIOSE NEONATAL BOVINA" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Domingos da Silva Leite/Prof. Dr. Tomomasa Yano/Geórgio Freesz Valadares está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 09 de setembro de 2004.

CERTIFICATE

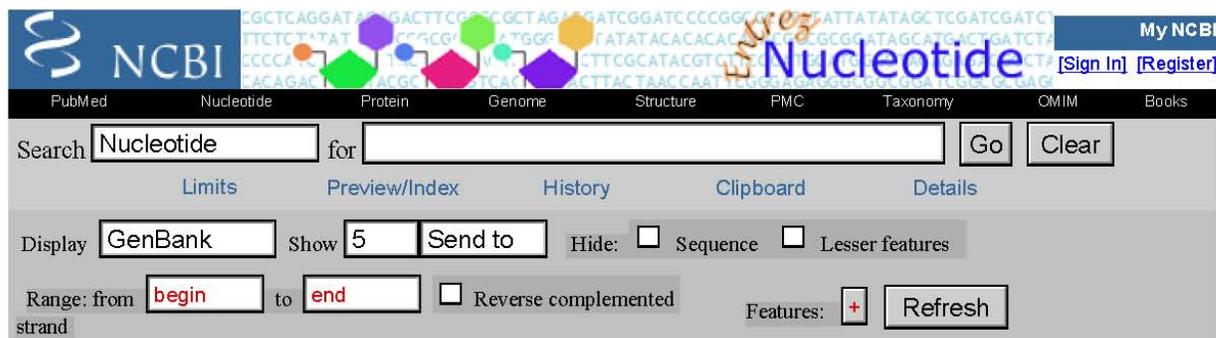
We certify that the protocol nº 719-1, entitled "CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE NEW COLONIZATION FACTOR EXPRESSED BY ESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED FROM BOVINE NEONATHAL COLIBACIOSIS DIARRHEA CASES", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on September 9, 2004.

Campinas, 09 de setembro de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária

NCBI Sequence Viewer v2.0



NCBI Nucleotide search interface. The search bar contains 'Nucleotide' and 'for'. Below the search bar are tabs for 'Limits', 'Preview/Index', 'History', 'Clipboard', and 'Details'. The 'Display' section shows 'GenBank' selected, 'Show 5', and 'Send to'. The 'Range' section shows 'begin' to 'end' and 'Reverse complemented' checked. A 'Refresh' button is present.

1: [AY462136](#). Reports Escherichia coli ...[gi:50957227] Links

[Comment](#) [Features](#) [Sequence](#)

LOCUS AY462136 849 bp DNA linear BCT 04-AUG-2004
 DEFINITION Escherichia coli strain CG-1905B putative colonization factor gene, complete cds.
 ACCESSION AY462136
 VERSION AY462136.2 GI:50957227
 KEYWORDS .
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM [Escherichia coli](#)
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 849)
 AUTHORS Valadares,G.F., Leite,D.S. and Yano,T.
 TITLE DNA Sequence of the main subunit of a putative new colonization factor of Escherichia coli isolated from bovine neonatal diarrhea
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 849)
 AUTHORS Valadares,G.F., Leite,D.S. and Yano,T.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (10-NOV-2003) Microbiologia e Imunologia, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Cidade Universitaria Zeferino Vaz - Instituto de Biologia, Campinas, SP 13083970, Brazil
 REFERENCE 3 (bases 1 to 849)
 AUTHORS Valadares,G.F., Leite,D.S. and Yano,T.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (03-AUG-2004) Microbiologia e Imunologia, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Cidade Universitaria Zeferino Vaz - Instituto de Biologia, Campinas, SP 13083970, Brazil
 REMARK Sequence update by submitter
 COMMENT On Aug 4, 2004 this sequence version replaced gi:[38569890](#).
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..849
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="CG-1905B"

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=50957227> (1 of 2)28/9/2006 00:19:07

NCBI Sequence Viewer v2.0

```

/isolation_source="bovine neonatal diarrhea"
/db_xref="taxon:562"
CDS
1..849
/note="PCF; main subunit"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="putative colonization factor"
/protein_id="AAR24463.2"
/db_xref="GI:50957228"
/translation="MKKTLIALAVAASAVSGMAHAWTNGDFNGSVDIGGSITADDYRQ
KSWAVGSDINGFSNALTDLTDGGTKLTI TVSGNKPILLGKTTEAFAAPVDAGVGA KP
QITFTDYEGQKVALQYEHNNKDGLGYFVLPKNTDGTIKIGSLKANVAYAGAASV GKDG
QGYIGSLSERDWSIFKGG LGAYGSASVLDGGDAAAERTALFGSLSQARDASTDSSPKM
QEFVLTARTGSI GENMKYTDGTVVSTAYAMGIANGQTI EATFDQAVTASTQWSAPLN
VAVTYN"

```

ORIGIN

```

1 atgaaaaaga ctttgattgc actggetgtg gctgcctctg ctgtatctgg tatggcacat
61 gcttggaacga atggtgattt caatggttcg gttgatatcg gtggtagtag cactgcagat
121 gattatcgtc agaaatggtc atgggcagtt ggtagcgaca tcaatggatt tagtaatgca
181 ttaacggatc tgactgacgg tggaaacaaa ctgaccatta ctgtaagtgg taataagcca
241 atcctgtag gtaagacaac tgaagcgttt gctgctccag ttgatgcagg cgtgggagca
301 aaacctcaa ttacctttac tgattatgaa ggacaaaaag tcgcattgca gtatgagcat
361 aataacaagg atggcttggg ttatthttgtg ttgccaatga aaaataccga tggactaag
421 atcggtagcc ttaaggctaa tgtggcctat gctggtgagg catctgttgg taaagatggt
481 caaggctaca ttggttact ttctgaacga gactggagta tctttaaggg gggcttaggt
541 gcatatggtt cagcatcagt gctggatggc ggggatgagg ctgccgaacg tactgettta
601 ttcggttcgt tatctcaagc ccgagatgct tcaacagatt caagcccga aatgcaggag
661 tttccggtct tgacagcccg tactggttct attggtgaga atatgaaata cactgatgga
721 actgttggtt caacagcata tgcaatgggt attgctaacg gtcagactat tgaggcgact
781 tttgatcaag ctgtaactgc cagcactcaa tggagcgctc cgctgaacgt agcagttact
841 tataactaa

```

//

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

Sep 27 2006 15:22:06