

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Maria Claudia Peroto

Estudo de cepas de *Escherichia coli* portadoras dos genes da toxina citoletal distensora isoladas de humanos, animais e alimentos.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Maria Claudia Peroto

[Signature]

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P424e

Peroto, Maria Claudia

Estudo de cepas de *Escherichia coli* portadoras dos genes da toxina citoletal distensora isoladas de humanos, animais e alimentos / Maria Claudia Peroto. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Domingos da Silva Leite.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. Toxinas. 3. Toxina citoletal distensora. 4. Filogenia. 5. Eletroforese em gel de campo pulsado. I. Leite, Domingos da Silva. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Studies of cytolethal distending toxin *Escherichia coli* strains isolated from humans, animals and food.

Palavras-chave em inglês: *Escherichia coli*; Toxins; Cytolethal distending toxin; Filogeny; Pulsed-field gel electrophoresis.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Domingos da Silva Leite, Cleide Ferreira Catani, Marcelo Brocchi.

Data da defesa: 29/08/2007.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 20 de agosto de 2007.

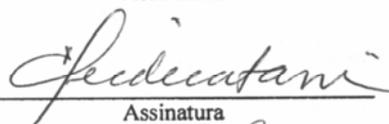
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite (Orientador)



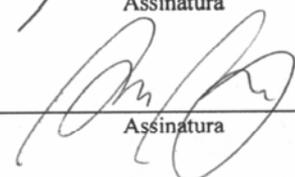
Assinatura

Dra. Cleide Ferreira Catani



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano

Assinatura

Profa. Dra. Gleize Villela Carbonell

Assinatura



LAERTE. **Deus 2, a graça continua.** Olho d'água, São Paulo, SP. 2002

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, José Antonio Peroto e Sonia Teresinha Pigato Peroto; ao meu querido companheiro Márcio Paduan Donadio; e aos meus sogros, Mário Donadio e Aracélis Paduan Donadio, que são os meus segundos pais.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem a existência de algumas pessoas, sem o auxílio de outras e muito menos sem o apoio psicológico de algumas outras. É o nome destas pessoas que gostaria de deixar aqui registrado.

Agradeço, em primeiro lugar, ao Deus infinitamente justo e bom, a causa primeira de todas as coisas, que com seu Amor infinito criou nossos espíritos simples e ignorantes para que pudéssemos crescer intelectual e moralmente de acordo com nossos próprios esforços ao longo dos séculos.

Agradeço, em segundo lugar, porém, nem por isso menos importante, a meus pais queridos, José Antonio e Sonia, por terem me aceitado como filha. Eles me fizeram estudar muito por acreditarem que a única herança que os pais realmente podem deixar aos seus filhos é a moral e os estudos e, por isso, aceitaram que eu fosse estudar na Unicamp, apesar do enorme sofrimento que isso causou a eles. Mas mesmo assim, sempre me estimularam.

Agradeço ao meu querido Marcinho, meu namorado, meu marido, a pessoa mais linda da minha vida, que é muito paciente e amoroso. Que sempre me ajudou nos momentos mais difíceis e nos muito alegres; que mesmo sem fazer “a mais remota idéia” do assunto da minha pesquisa, me ouvia falar e tentava entender. Agradeço também ao Mário e à Aracélis (os pais do Márcio), duas pessoas lindas de coração e que sempre me ajudaram, em todos os momentos, com muitos incentivos.

Devo um agradecimento especial ao meu orientador, o Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, que me aceitou como orientada em um momento difícil do meu mestrado, quando tive de trocar de orientador no meio do caminho. Ele me aceitou, me ensinou e me orientou durante estes dois anos e meio.

Agradeço ao apoio do pessoal do laboratório: Claudia, Daniela, Erivaldo, Gustavo, Mirtis e Monique pelo auxílio que me deram sempre que podiam. E sempre puderam.

Sou grata ao auxílio dos Profs. Drs. Marcelo Brocchi e Gonçalo Pereira por terem permitido que eu usasse o equipamento de PFGE. Da mesma forma agradeço ao Marcelo Lanceloti, ao Dãã (cujo apelido é Gustavo Gregoracci) e à Silvia Kazue

por terem me ensinado a realizar o milhão de passos necessários ao PFGE e a operar o equipamento todo.

Agradeço às Profas. Dras. Gleize Carbonell e Clarice Arns, por terem participado da pré-banca e por terem dado sugestões importantes para o trabalho. Da mesma forma que agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi e à Dra. Cleide Catani, por terem participado da banca de avaliação da minha dissertação e, também, por terem dado sugestões importantes para as correções finais.

Agradeço aos meus amigos da turma “bio99diurno”, toda a minha turma de faculdade, por ter compartilhado comigo toda a grande aquisição de conhecimento que foi a graduação. Agradeço, em especial, à Adriana, à Lívia e à Roberta, que junto comigo formávamos um quarteto inseparável nos trabalhos de graduação e nas bagunças.

Agradeço aos meus amigos coralísticos, o pessoal cantante mais animado que eu já conheci e que sempre estiveram dispostos a dar uma palavra de apoio quando eu não estava tão bem: Volnei, Erick, Marlem, Carolzinha, Samuel, Tiago, Sally, Thammy, Érika “san”, Alexandrina e todo o pessoal do “nosso” Coral Ars Musicalis, incluindo o nosso regente, Hermes Coelho, que nos anima com as lindas obras coro-sinfônicas que sempre fazemos.

Gostaria ainda de agradecer aos meus amigos, sempre cantantes (de alguma forma ou em algum lugar) e sempre felizes e próximos: Ana Maria (minha irmã neguinha), Sileno, um amigo querido e Danilo, meu amigo de corais, óperas e viagens.

Como sempre, falta agradecer a um monte de gente e sempre muitas pessoas não são citadas nominalmente, mas todas elas são importantes porque passaram por nossas vidas.

INTRODUÇÃO		1
<hr/>		
1.	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	2
1.1.	GRUPOS DIARREIOGÊNICOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	2
1.1.1.	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica - EPEC	2
1.1.1.1.	Intimina	3
1.1.2.	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica - EHEC.....	4
1.1.2.1.	Verotoxina - VT.....	5
1.1.3.	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica - ETEC	7
1.1.4.	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa - EAEC	8
1.1.5.	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente – DAEC	9
1.1.6.	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva - EIEC	9
2.	TOXINA CITOLETAL DISTENSORA - CDT	10
2.1.	HISTÓRICO DE CDT	10
2.2.	COMPARAÇÃO DE CDT COM OUTRAS TOXINAS BACTERIANAS.....	10
2.3.	CDT NAS ESPÉCIES BACTERIANAS	11
2.4.	NOMENCLATURA DE CDT.....	12
2.5.	OS GENES DE CDT	12
2.5.1.	Íntrons em <i>cdt</i>	13
2.6.	CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS, ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS CDTA, CDTB E CDTC	14
2.6.1.	Homologias e análise filogenética de CdtB	17
2.7.	AÇÃO DE CDT EM CULTURAS DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS	17
2.7.1.	Ação de CDT sobre o DNA	20
2.7.2.	Ação de CDT sobre os filamentos de actina.....	21
2.8.	AÇÃO DE CDT <i>IN VIVO</i>	22
2.8.1.	CDT e câncer.....	23
2.9.	PESQUISAS SOBRE CDT EM HUMANOS E ANIMAIS E ALIMENTOS.....	24
3.	FILOGENIA DE <i>E. COLI</i>	27
3.1.	OS GRUPOS FILOGENÉTICOS A, B1 B2 E D DE <i>E. COLI</i>	27
3.2.	<i>PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS</i> OU PFGE.....	29
3.2.1.	Estudos de <i>E. coli</i> usando PFGE	31
OBJETIVOS		33
<hr/>		
1.	GERAL	34
2.	ESPECÍFICOS	34
MATERIAL E MÉTODOS		35
<hr/>		
1.	CEPAS BACTERIANAS	36
1.1.	MANUTENÇÃO E CRESCIMENTO DAS CEPAS	36
2.	EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO	36
3.	REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)	38
3.1.	GENES <i>CDT</i> , <i>VT</i> , <i>EAE</i> , <i>CHUA</i> , <i>YJAA</i> E FRAGMENTO TSPE4.C2	38

3.1.1.	Preparo da reação	38
3.1.2.	Programação do termociclador	38
3.1.3.	Visualização da amplificação	38
4.	ESTUDOS FILOGENÉTICOS	39
4.1.	ESTUDO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS A, B1, B2 E D	39
4.2.	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÔMICA USANDO PFGE.....	42
4.2.1.	Preparo das amostras bacterianas em blocos de agarose	42
4.2.2.	Tratamento dos blocos de agarose.....	43
4.2.3.	Digestão do DNA contido nos blocos.....	43
4.2.4.	Corrida eletroforética	44
4.2.5.	Análise de dados	45

RESULTADOS **46**

1.	FONTE, ORIGEM E SOROTIPOS DAS CEPAS DE <i>E. COLI</i>.....	47
2.	CDT	49
2.1.	CEPAS PORTADORAS DO ALELO CDT-V	51
3.	FATORES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS	54
3.1.	CONFIRMAÇÃO DE VT	54
3.2.	CONFIRMAÇÃO DE <i>EAE</i>	56
4.	FILOGENIA <i>ECOR</i> SEGUNDO CLERMONT <i>ET AL.</i> (2000)	57
4.1.	CONTROLES PARA <i>CHUA</i> , <i>YJAA</i> E <i>TsPE4.C2</i>	57
4.2.	PCR DE <i>CHUA</i> , <i>YJAA</i> E <i>TsPE4.C2</i> E OS GRUPOS FILOGENÉTICOS	58
4.3.	GRUPOS FILOGENÉTICOS, ALELOS DE CDT E OUTROS FATORES DE VIRULÊNCIA.....	61
4.4.	GRUPOS FILOGENÉTICOS, FONTES E ORIGENS DAS CEPAS	65
4.5.	SOROTIPOS O91:H21, O113:H21, O116:H21.....	66
4.5.1.	Análise das cepas de O91:H21, O113:H21, O116:H21 por PFGE	67

DISCUSSÃO **71**

CONCLUSÕES **81**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **83**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema proposto por Clermont <i>et al.</i> (2000) para classificação filogenética. _____	29
Figura 2: Distribuição das cepas quanto à fonte de que foram isoladas. _____	48
Figura 3: Distribuição das cepas bacterianas quanto ao país de origem. _____	49
Figura 4: Perfil eletroforético dos amplificadores das reações multiplex e de identificação de alelos I/IV e II/III de CDT. _____	50
Figura 5: Perfil eletroforético dos alelos de CDT I a IV. _____	51
Figura 6: Perfil eletroforético de <i>cdtA</i> e <i>cdtC</i> de CDT-V. _____	52
Figura 7: Distribuição dos alelos de CDT nas cepas estudadas. _____	54
Figura 8: Ocorrência, em porcentagem, dos genes da verotoxina dentre as cepas estudadas. _____	55
Figura 9: Perfis eletroforéticos dos amplificadores de VT. _____	55
Figura 10: Perfil eletroforético do produto de amplificação de <i>eae</i> . _____	56
Figura 11: Determinação dos controles usando cepas patogênicas e não patogênicas. _____	58
Figura 12: Distribuição das cepas nos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D. _____	59
Figura 13: Alelos de CDT em cada grupo filogenético. _____	62
Figura 14: Distribuição dos alelos de CDT dentro do grupo de cepas humanas isoladas pela COLIRED-O157. _____	63
Figura 15: Distribuição dos alelos de CDT dentro do grupo de cepas VTEC. _____	65
Figura 16: Fontes das cepas em cada grupo filogenético. _____	66
Figura 17: Dendrograma das cepas pertencentes ao sorotipo O91:H21. _____	68
Figura 18: Dendrograma das cepas pertencentes ao sorotipo O113:H21. _____	69
Figura 19: Dendrograma das cepas pertencentes ao sorotipo O116:H21. _____	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Cepas de <i>E. coli</i> isoladas de humanos, animais e alimentos e seus respectivos sorotipos. _____	37
Tabela 2: Genes, temperatura de anelamento e tamanho dos produtos (em pares de base) utilizados na detecção de CDT, confirmação de VT e <i>eae</i> presentes e na classificação filogenética. _____	40
Tabela 3: Os sorotipos e cepas estudados. _____	43
Tabela 4: Condições de corrida eletroforética usadas no PFGE. _____	44
Tabela 5: Sorotipos e número de cepas de cada sorotipo. _____	48
Tabela 6: Cepas CDT-V organizadas quanto ao sorotipo a que pertencem. _____	53
Tabela 7: Grupos filogenéticos das 80 cepas segundo Clermont <i>et al.</i> (2000) e os fatores de virulência associados. _____	60
Tabela 8: Cepas, fontes e origens dos sorotipos estudados. _____	67

RESUMO

A toxina citoletal distensora, CDT, é uma citotoxina termolábil identificada em um grande número de enteropatógenos, entre eles *Escherichia coli*. Os genes de CDT são designados de *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* e estão arranjados em um operon e, até o momento, já foram descritos cinco diferentes alelos: I, II, III, IV e V. Cepas de *Escherichia coli* podem ser classificadas em quatro grupos filogenéticos ECOR: A, B1, B2 e D, nos quais as cepas pertencentes aos grupos A e B1 são consideradas comensais e patógenos oportunistas e as cepas agrupadas como B2 e D, como cepas patogênicas. Os objetivos deste trabalho foram relacionar os alelos da CDT e alguns fatores de virulência associados aos grupos filogenéticos ECOR e estudar três conjuntos de cepas por eletroforese de campo pulsado (PFGE). Foram utilizadas 80 cepas de *E. coli* cdt-positivas isoladas de suínos, bovinos, ovinos, humanos, água e carne. Os alelos da CDT e os grupos filogenéticos foram identificados através da reação de polimerase em cadeia (PCR). Vinte e cinco cepas dos sorotipos O91:H21, O113:H21 e O116:H21 foram estudadas por PFGE para avaliação da diversidade genética. Os resultados demonstraram que o alelo V da CDT foi o mais freqüente, presente em 45% das cepas, mostrando forte associação com VT2 (97%); o alelo III foi observado em 36,2% das cepas, mostrando associação com VT1 em 79,0% das cepas. O alelo I da CDT foi detectado em 8,7% das cepas e o alelo IV em 5,0% das cepas. No estudo filogenético, 45 cepas (56,0%) foram agrupadas em B1, 15 cepas em B2 (18,7%), 13 cepa em D (16,2%) e sete cepas em A (8,7%). Nos ensaios de PFGE foi possível identificar, entre as cepas de um mesmo sorotipo, desde clones até cepas não relacionadas entre si. Os dados obtidos permitem concluir que no conjunto de cepas estudado o alelo CDT-V está associado ao grupo filogenético B1 enquanto o alelo CDT-III está associado aos grupos B2 e D.

ABSTRACT

Cytolethal distending toxin, CDT, is a termolabile cytotoxin found in a great number of enteropathogens, including *Escherichia coli*. The CDT genes are called *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* and they are placed in an operon and five alleles (I, II, III, IV and V) were described until the moment. *E. coli* strains may be classified in four ECOR phylogenetic groups: A, B1, B2 and D; strains belonging to A and B1 groups are called commensal or opportunist pathogens and strains grouped as B2 and D, as pathogenic strains. The goals of this work were to relate the CDT alleles and some virulence factors associated to four ECOR phylogenetic groups and analyze three strain sets by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). This study used 80 *cdt*-positive *E. coli* strains isolated from swines, bovines, ovines, humans, water and meat. CDT alleles and phylogenetic groups were identified using polymerase chain reaction (PCR). Twenty-five strains belonging to O91:H21, O113:H21 and O116:H21 serotypes were studied by PFGE for evaluation of genetic diversity. The results show that CDT-V was the most frequent allele, present in 45,0% of strains, and showing strong association with VT2 (97%); CDT-III was observed in 36,2% of strains, showing association with VT1 in 79,0% of strains. CDT-I was detected in 8,7% of strains and CDT-IV, in 5,0%. In the phylogenetic studies, 45 strains (56,0 %) was grouped in group B1, 15 strains (18,7%) was grouped in B2, D grouped 13 strains (16,2%) and the group A congregated 7 strains (8,7%). In PFGE studies it was possible to identify, in the same serotype, since clones until non-related strains. For the studied strains, data allows to conclude that CDT-V is associated to phylogenetic group B1 and CDT-III is associated to B2 and D groups.

INTRODUÇÃO

1. *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli é uma espécie geneticamente diversa. Habitante normal do trato intestinal de muitos organismos, incluindo o homem, sendo que a maioria dos isolados é composta por cepas comensais (Boyd & Hartl, 1998; Clermont *et al.*, 2000). No entanto, algumas cepas podem causar infecções intestinais e extra-intestinais em um amplo espectro de hospedeiros. Como exemplo, temos o fato de que *E. coli* é responsável por um terço dos casos de meningite neonatal, com a incidência de 0,1 por 1000 nascidos vivos (Bonacorsi *et al.*, 2000). *E. coli* também é a causa mais comum de septicemias adquiridas na comunidade ou no ambiente hospitalar nos EUA (Sannes *et al.*, 2004).

1.1. GRUPOS DIARREIOGÊNICOS DE *ESCHERICHIA COLI*

Quando se leva em conta as infecções intestinais causadas por *E. coli* em humanos, há pelo menos seis grupos conhecidos: *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) e *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC). Estes seis grupos estão bem revisados em Nataro & Kaper (1998) e Kaper *et al.* (2004).

1.1.1. *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICA - EPEC

EPEC foi o patotipo de *E. coli* descrito após ter sido identificado em um surto de diarreia infantil no Reino Unido em 1945, sendo até a atualidade uma importante

causa de diarreia infantil potencialmente fatal nos países em desenvolvimento (Kaper *et al.*, 2004).

Associado às infecções por EPEC há uma histopatologia intestinal muito característica chamada de *attachment and effacement* ou lesão A/E, na qual a bactéria se apresenta intimamente ligada às células do epitélio intestinal e causa mudanças marcantes no citoesqueleto da célula hospedeira, incluindo o acúmulo de actina polimerizada logo abaixo da célula aderente, que pode chegar a ter 10 µm de altura em relação à célula epitelial e possui uma estrutura semelhante aos pseudópodes. As microvilosidades intestinais são destruídas e emerge da célula epitelial uma estrutura em forma de pedestal sobre a qual está a bactéria (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

A habilidade de induzir a lesão A/E é codificada por genes localizados em uma ilha de patogenicidade de aproximadamente 35 kb denominada de *locus of enterocyte effacement* (LEE), na qual há genes que codificam um sistema secretório tipo III, muitas proteínas que são secretadas e uma adesina bacteriana denominada intimina, codificada pelo gene *eae* (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

1.1.1.1. INTIMINA

A íntima aderência de EPEC às células epiteliais se deve à intimina, cuja massa molecular varia entre 94 e 97 kDa. O gene *eae* (de *E. coli* attaching and effacing) está presente em todas as EPEC e EHEC e em cepas de *Citrobacter rodentium* e *Hafnia alvei* capazes de produzir a lesão A/E (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

A intimina não funciona somente como ligante para adesão às células epiteliais, mas também provoca o estímulo da resposta imune e a hiperplasia das criptas intestinais (Kaper *et al.*, 2004).

A região C-terminal da intimina é responsável pela ligação ao receptor, sendo sugerido que os 17 diferentes tipos e subtipos de intimina ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , κ , λ , μ , ν e ξ) são responsáveis por diferentes tropismos das células do tecido do hospedeiro (Blanco *et al.*, 2004).

Uma proteína denominada Tir (*translocated intimin receptor*) é secretada pela bactéria e inserida na membrana da célula hospedeira, onde funciona como receptor para a intimina, sendo um exemplo de um patógeno que providencia seu próprio receptor para a ligação à célula eucariótica (Kaper *et al.*, 2004).

1.1.2. ***ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRÁGICA - EHEC**

As EHEC foram identificadas pela primeira vez em humanos em 1982 e os surtos iniciais foram relacionados à ingestão de hambúrgueres mal cozidos em uma cadeia de restaurantes *fast-food*, mas surtos posteriores foram relacionados a molhos, leite não pasteurizado, alface, suco de maçã e alguns outros alimentos. Alguns surtos foram, também, associados à ingestão de água potável e de recreação pública, à transmissão interpessoal e a visitas a fazendas e zoológicos (Kaper *et al.*, 2004).

As EHEC receberam este nome devido ao fato de estarem associadas aos casos de colite hemorrágica; no entanto, as infecções causadas por EHEC podem variar desde diarreia branda e colite hemorrágica (diarreia sanguinolenta) até

síndrome urêmica hemolítica (HUS), que é caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e falha renal aguda potencialmente fatal (Kaper *et al.*, 2004).

O principal reservatório das EHEC é o trato intestinal bovino e o sorotipo O157:H7 é o mais importante entre as EHEC em países como os Estados Unidos, Reino Unido e Japão, mas os sorogrupos O26 e O111 também podem causar doenças e são mais importantes que O157:H7 em outros países (Kaper *et al.*, 2004).

As EHEC possuem como fatores de virulência principais a intimina e a verotoxina (ou toxina Shiga-*like*). O gene *eae*, que codifica a intimina, está localizado no cromossomo bacteriano na ilha de patogenicidade LEE, a mesma ilha de patogenicidade presente nas EPEC (ver item 1.1.1) (Kaper *et al.*, 2004).

Como há mais de 200 sorotipos de *E. coli* que produzem VT, mas não *eae*, criou-se o termo geral de VTEC ou STEC para as cepas que só produzem VT e o nome EHEC só é utilizado para as cepas que possuam os genes de VT e *eae* (Kaper *et al.*, 2004).

1.1.2.1. VEROTOXINA - VT

O nome verotoxina vem da ação da toxina ter sido observada inicialmente na cultura de células Vero, provenientes de rim de macaco verde. A toxina é codificada por genes de um pró-fago do tipo lambda e é denominada de verotoxina (VT) ou *Shiga-like toxin* (SLT ou Stx), pois apresenta grande homologia com a toxina de Shiga de *Shigella dysenteriae* do tipo 1. Duas variedades foram observadas, VT1 e VT2, e possuem 55% de homologia entre suas seqüências de aminoácidos. Os genes de VT1 são altamente conservados, ao passo que existem variações em VT2,

gerando as diferentes variantes denominadas de VT2c, VT2v, VT2vhb, VT2e, etc. (Nataro & Kaper, 1998; Blanco *et al.*, 2004; Kaper *et al.*, 2004).

A verotoxina é uma toxina AB₅, ou seja, a holotoxina é composta de cinco subunidades B idênticas de 7,7 kDa cada, que são responsáveis pela ligação da holotoxina ao receptor de membrana celular, o glicolípido globotriasolceramida (Gb3). A única subunidade A da holotoxina, de 32 kDa, é clivada proteoliticamente nos peptídeos A₁ e A₂ (de cerca de 28 kDa e 4 kDa, respectivamente) que ficam ligados por uma ponte dissulfeto. Após a toxina se ligar ao receptor e ser endocitada, ela é transportada pelo aparato de Golgi até o retículo endoplasmático, após isso a subunidade A é levada até o citoplasma, onde o peptídeo A₁ remove uma única adenina da unidade 28S do rRNA dos ribossomos eucarióticos causando a interrupção da síntese protéica da célula hospedeira e, conseqüentemente, sua morte (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

A verotoxina é produzida pela bactéria no cólon, absorvida pela mucosa colônica e, via pela corrente sangüínea, alcança os rins, onde danifica as células do epitélio renal provocando a oclusão microvascular através de uma combinação de toxicidade direta e indução local de citocinas e quimiocinas, resultando em inflamação renal que pode levar à HUS (Kaper *et al.*, 2004).

A verotoxina também induz a apoptose das células do epitélio intestinal, através de um processo regulado pela família de proteínas Bcl-2; e medeia dano local ao cólon, que resulta em diarréia sanguinolenta, colite hemorrágica, necrose e perfuração intestinal (Kaper *et al.*, 2004).

1.1.3. ***ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÊNICA - ETEC**

As ETEC causam diarreia aquosa, que pode variar de amena a severa. São também uma importante causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento e a principal causa de diarreia em viajantes (Kaper *et al.*, 2004).

As ETEC colonizam a superfície da mucosa do intestino delgado e, então, elaboram suas enterotoxinas, que levam à secreção intestinal. As cepas de ETEC causam a diarreia através da ação das enterotoxinas LT (*heat-labile toxin*) e ST (*heat-stable toxin*), sendo que estas cepas podem expressar somente LT ou ST ou ambas (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

A classe de toxinas LT é proximamente relacionada estrutural e funcionalmente com a enterotoxina colérica, sendo que a holotoxina é termoinstável e possui a forma AB₅. Há dois grandes grupos de LT, LT-I e LT-II, que não reagem de forma cruzada em testes sorológicos. LT-I é expressa por cepas de *E. coli* patogênicas a humanos e animais, ao passo que cepas produtoras de LT-II são encontradas primariamente em animais e só raramente em humanos, mas não está associada à doença em nenhum destes organismos (Nataro & Kaper, 1998).

As toxinas ST são peptídeos compostos de apenas uma cadeia polipeptídica, sendo que há duas classes (ST-I e ST-II) não relacionadas estruturalmente e no modo de ação. A termoestabilidade das proteínas ST se deve às pontes dissulfeto existentes na estrutura terciária, sendo três pontes dissulfeto em ST-I e duas pontes em ST-II (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

1.1.4. ***ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA - EAEC**

Também chamadas de EA_gEC, as EAEC são responsáveis por diarreias persistentes em adultos e crianças tanto em países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento, sendo identificados também como causa de muitos surtos por todo o mundo (Kaper *et al.*, 2004).

As EAEC são, por definição, *E. coli* que não secretam LT ou ST e que aderem *in vitro* em células HEp-2 (de trato respiratório humano) em um padrão agregativo no qual as bactérias aderem umas às outras em uma configuração semelhante a tijolos empilhados. É fato que esta definição é válida tanto para clones patogênicos quanto não patogênicos; no entanto, a patogenicidade de EAEC em humanos foi comprovada através do estudo com voluntários e de surtos e está provado que pelo menos um subgrupo das EAEC são patógenos de humanos (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Alguns dos fatores de virulência e toxinas presentes em EAEC são as fímbrias de aderência agregativa (AAFs), uma toxina chamada Pic, que é uma protease auto-transportadora com atividade de mucinase, e uma outra toxina auto-transportadora chamada Pet, que tem uma atividade enterotóxica e que potencialmente pode levar a mudanças do citoesqueleto e do envoltório das células epiteliais através da clivagem da proteína citoesquelética espectrina (Kaper *et al.*, 2004).

A estratégia de colonização de EAEC compreende a colonização da mucosa intestinal, predominantemente o cólon, seguida de secreção de enterotoxinas e citotoxinas levando a um dano moderado, porém significativo da mucosa intestinal (Kaper *et al.*, 2004).

1.1.5. *ESCHERICHIA COLI* DIFUSAMENTE ADERENTE – DAEC

Por definição, as DAEC apresentam um padrão característico de aderência difusa em monocamadas de células HeLa (de câncer de útero humano) ou HEP-2. Apesar do papel das DAEC na diarreia ser controverso, as cepas deste patótipo são tidas, em muitos estudos, como causa de diarreia em crianças acima de um ano de idade (Trabulsi *et al.*, 1999; Kaper *et al.*, 2004).

Duas adesinas são as possíveis responsáveis pela adesão difusa presente nas DAEC, uma delas, a adesina fimbrial F1845 (codificada por genes cromossômicos) ocorre em aproximadamente 75% das DAEC. A segunda adesina, AIDA-I, é não fimbrial e é codificada por genes localizados em um plasmídeo (Trabulsi *et al.*, 1999; Kaper *et al.*, 2004).

As cepas DAEC apresentam um efeito citopático que é caracterizado pela indução dos enterócitos do intestino delgado a manifestarem o crescimento de projeções celulares semelhantes a dedos, que envolvem as bactérias aderentes (Kaper *et al.*, 2004).

1.1.6. *ESCHERICHIA COLI* ENTEROINVASIVA - EIEC

As EIEC são relacionadas à *Shigella* tendo em comum muitas características bioquímicas, genéticas, antigênicas e de patogenicidade; como exemplo tem-se que *Shigella* e EIEC são imóveis em condições normais e são lisina descarboxilase e lactose negativas (Trabulsi *et al.*, 1999; Kaper *et al.*, 2004).

Estudos sugerem que a patogênese de EIEC e de *Shigella* sigam virtualmente o mesmo esquema, pois ambos os organismos invadem o epitélio do cólon. Clinicamente, as infecções se manifestam por diarreia aquosa que pode se tornar

sanguinolenta, com a presença de leucócitos e muco, sendo freqüentemente acompanhada por dores abdominais e febre. As infecções provocadas por EIEC são mais freqüentes em crianças maiores de dois anos e em adultos (Trabulsi *et al.*, 1999; Kaper *et al.*, 2004).

Os genes responsáveis pela penetração de EIEC nas células epiteliais estão localizados em um plasmídio que varia entre 120 e 140 MDa e, apesar de serem proximamente relacionadas à *Shigella*, ao contrário de *Shigella dysenteriae* tipo I as EIEC não produzem verotoxina (Trabulsi *et al.*, 1999).

2. TOXINA CITOLETAL DISTENSORA - CDT

2.1. HISTÓRICO DE CDT

A toxina citoletal distensora foi inicialmente relatada em 1987 com um novo tipo de atividade tóxica produzida por cepas patogênicas (EPEC e necrotoxigênicas – NTEC) de *E. coli*. A característica principal do efeito citotóxico observado era uma distensão notável da célula, evidente de 3 a 5 dias após a adição do sobrenadantes da cultura bacteriana às células de cultivo e resultando na morte da célula. Os mesmos autores identificaram, posteriormente, uma atividade similar em *Shigella* e em *Campylobacter* spp., e designaram esta toxina provável como a toxina citoletal distensora (CLDT) (Janka *et al.*, 2003; Thelestam & Frisan, 2004).

2.2. COMPARAÇÃO DE CDT COM OUTRAS TOXINAS BACTERIANAS

As mudanças celulares grosseiras associadas à atividade de CDT são claramente diferentes daquelas causadas por outras toxinas conhecidas, incluindo a LT, STs, VTs de *E. coli*. Embora CDT induza o alongamento das células de ovário de

hamster chinês (CHO), como aquela associada com a LT, a progressão à distensão celular e a morte da célula são únicas de CDT. Além disso, as células Y-1, provenientes da adrenal de camundongo, são sensíveis à LT, mas não à CDT. Em comparação com CDT, VT1 de *E. coli* causa a morte rápida da célula sem distensão e é ativa nas células CHO. Há algumas similaridades entre CDT e o fator citotóxico necrotizante (CNF), mas enquanto CNF causa distensão da célula e multinucleação geral em células CHO, a distensão da célula induzida por CDT é mais evidente e somente uma limitada multinucleação é observada (Aragon *et al.*, 1997).

Segundo Bielaszewska e colaboradores (2005), embora VT seja presumivelmente um dos principais fatores de virulência responsáveis pelos danos às células endoteliais durante a infecção de VTEC, diversas evidências sustentam uma potencial contribuição de CDT na patogênese de VTEC, em particular as causadas por VTEC *eae* negativas.

2.3. CDT NAS ESPÉCIES BACTERIANAS

A CDT tem sido descrita em diferentes espécies bacteriana Gram-negativas, todas conhecidas como patógenos de mucosas no homem e nos animais, incluindo *Haemophilus ducrey*; *Shigella* spp., incluindo *Shigella dysenteriae* tipo 1 e 2 e *S. boydii* tipo 7; *E. coli*, com isolados pertencentes principalmente a ETEC, EPEC e EAEC; *Campylobacter jejuni*, *C. fetus* e *C. coli*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Helicobacter hepaticus*, *H. pullorum*, *H. cinaedi*, *H. canis*, *H. bilis*, *H. marmotae* e até uma espécie de *Helicobacter* murina ainda não descrita. Até o momento, CDT não foi identificado em nenhuma bactéria Gram-positiva (Aragon *et al.*, 1997; de Rycke & Oswald, 2001; Taylor *et al.*, 2003; Thelestam & Frisan, 2004).

2.4. NOMENCLATURA DE CDT

Dado o grande número de espécies bacterianas em que CDT foi relatada, uma unificação da nomenclatura se tornou necessária, por isso, em 2004, Thelestam e Frisan propuseram que um CDT particular fosse indicado com as iniciais da bactéria produtora antes de CDT e, se necessário, o número da cepa ou uma outra designação comum após CDT, por exemplo: HdCDT, se referindo ao CDT produzido por *H. ducreyi* (Thelestam & Frisan, 2004). Contudo, até o momento, não se observa que a comunidade científica tenha aceitado inteiramente essa proposta.

2.5. OS GENES DE CDT

A toxina citoletal distensora é codificada por um operon de cerca de 2.100 pb (dependendo da espécie em que está presente) composto por três genes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) adjacentes e ligeiramente sobrepostos (Pickett *et al.*, 1994).

Em *E. coli*, cinco variantes genéticas foram designadas: *cdt-I*, *cdt-II*, *cdt-III*, *cdt-IV* e *cdt-V* (Bouzari *et al.*, 2005). Os diferentes alelos de CDT-I (Scott & Kaper, 1994), CDT-II (Pickett *et al.*, 1994), CDT-III (Pérès *et al.*, 1997) e CDT-IV (Tóth *et al.*, 2003) foram identificados em cepas de *E. coli* enteropatogênica e de infecções extra-intestinais tanto no homem quanto em animais. O quinto conjunto alélico da CDT foi descrito por Bielaszewska *et al.* (2004) em cepas *E. coli* O157:H- verotoxigênicas fermentadoras de sorbitol, recebendo a denominação de CDT-V. Este último apresentou grande homologia (>98%) com o alelo III, estando as poucas diferenças presentes nos genes para as subunidades A e C.

Dos cinco alelos de CDT somente o alelo III é encontrado no DNA plasmidial das bactérias, ao passo que os outros quatro alelos (CDT-I, CDT-II, CDT-IV e CDT-

V) se situam no DNA genômico. Um fato interessante sobre a localização dos alelos de CDT é que mesmo CDT-V tendo uma alta homologia com CDT-III, a ponto de ser considerada uma variante de CDT-III, CDT-V possui localização genômica e não plasmidial (Pérès *et al.*, 1997; Bielaszewska *et al.*, 2004).

As seqüências primárias de CDTs dos vários organismos geralmente não são muito conservadas. Diferenças notáveis são vistas nas seqüências dos aminoácidos das subunidades CdtA e CdtC. Por exemplo, as porcentagens de identidade de aminoácidos entre CDT de *E. coli* e de *A. actinomycetemcomitans* são 25,9% para CdtA, 48% para CdtB e 19,2% para CdtC (Pickett & Whitehouse, 1999). As características não conservadas encontradas nas subunidades de CDT (especialmente em CdtA e em CdtC) podem mostrar adaptação espécie-específica da toxina CDT a uma estratégia da infecção de bactérias produtoras de CDT (Yamada *et al.*, 2006).

2.5.1. ÍNTRONS EM CDT

Íntrons são raramente encontrados nas eubactérias, sendo observados, por exemplo, em genes associados com a transferência conjugal de *Clostridium difficile* e de *Lactobacillus lactis* e em genes codificantes de proteínas de *C. difficile* e de *Bacillus anthracis*. Mais recentemente, foram encontrados íntrons nos genes de CDT de *A. actinomycetemcomitans* e de *E. coli*, podendo o *splicing* dos transcritos de *cdt* servir como um meio para o controle pós-transcricional, regulando a expressão de proteínas da CDT (Tan *et al.*, 2005).

Há ainda a importante função do RNA de *cdtC*, que pode catalisar o *splicing* do RNA de *ltxA* (um RNA heterólogo) nas configurações *cis* e *trans*, indicando que o RNA de *cdtC* sozinho é uma ribozima cataliticamente ativa (Tan *et al.*, 2005).

2.6. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS, ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS

CDTA, CDTB E CDTC

As proteínas codificadas pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* são, respectivamente, CdtA, CdtB e CdtC. As massas moleculares preditas para estas três proteínas varia entre 22 e 35 kDa para CdtA, 27 a 30 kDa para CdtB e entre 18 e 21 para CdtC (Aragon *et al.*, 1997; de Rycke & Oswald, 2001). Esta variação tão grande da massa molecular das proteínas CDT se deve ao grande número de espécies nas quais estão presentes. Em *H. ducreyi*, por exemplo, CdtA tem 23 kDa, CdtB tem 29 kDa e CdtC tem 21 kDa e seus pontos isoelétricos (p.I.) preditos são de 5,7 para CdtA, 8,3 para CdtB e 6,3 para CdtC (Thelestam & Frisan, 2004).

A toxina CDT é uma proteína multimérica formada pelas proteínas CdtA, CdtB e CdtC na proporção de 1:1:1 e é extremamente instável e, por isso, tem grande propensão a agregar, é termoinstável e perde a atividade se não houver sacarose nas soluções tampão em que está em suspensão (Aragon *et al.*, 1997; Ueno *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2006).

A holotoxina CDT é uma toxina da forma AB₂, sendo “A” a subunidade enzimaticamente ativa (CdtB, no caso) e “B₂”, composto por CdtA e CdtC, a subunidade heterodimérica requerida para a entrega de CdtB na célula alvo (Lara-Tejero & Galán, 2001). Em suporte a estes dados, Lara-Tejero e Galán ainda identificaram, através de alinhamento de seqüências, que CdtA tem uma região de

cerca 60 aminoácidos que é similar ao enovelamento de lecitina presente na cadeia “B” das toxinas ricina e da abrina, duas toxinas AB muito bem caracterizadas (Lara-Tejero & Galán, 2001).

A possível atividade de DNase de CdtB foi identificada em 2000, quando Lara-Tejero e Galán alinharam CdtB com diversas outras seqüências e observaram que um padrão de homologia foi encontrado nos resíduos específicos envolvidos na catálise enzimática (Glu86, His154, Asp229, His261), na ligação ao DNA (Arg123, Asn194) e na ligação de íons metálicos (Glu62, Asp192, Asp260). CdtB-II de *E. coli* também tem uma seqüência pentapeptídica (aminoácidos 259-263: Ser-Asp-Ser-Tyr-ser-Asp-His-Tyr-Pro) encontrada em todas as enzimas DNase I. Resíduos conservados similares foram descritos para CdtB de *C. jejuni* e, depois, identificados em todas CdtBs conhecidas. A atividade de DNase de CdtB ficou comprovada quando os resíduos de aminoácidos His152, componente do sítio ativo de outras DNases tipo I, e Asp185, essencial para a ligação de magnésio, foram mutados e a subunidade CdtB perdeu completamente sua atividade de DNase (Lara-Tejero & Galán, 2000).

Os dados de Lara-Tejero e Galán foram corroborados pela pesquisa de Nešić e colaboradores que, em 2004, resolveram a estrutura de CDT *H. ducreyi* e obtiveram que esta toxina consiste em uma enzima que pertence à família da DNase I por apresentar o enovelamento característico da família da DNase I: um sanduíche de 12 folhas β envolvidas por α -hélices externas e *loops* em cada lado do sanduíche de folhas β , e CdtB é ligada a dois domínios de lecitina semelhantes ao da ricina (CdtA e CdtC). Obteve-se, ainda, que a porção N-terminal do peptídeo CdtC pode

bloquear o sítio ativo de CdtB, reduzindo desse modo sua atividade. A estrutura da holotoxina de CDT mostrou também que CdtA e CdtC formam uma potencial fenda de ligação de peptídeo, possivelmente um receptor. A ausência de qualquer uma destas subunidades diminui a atividade de CDT (Nešić *et al.*, 2004; Akifusa *et al.*, 2005). Então, as subunidades CdtA e CdtC junto com CdtB constituem a molécula heterodimérica requerida para que a CDT consiga se ligar à célula alvo e seja internalizada (Lara-Tejero & Galán, 2001; Lee *et al.*, 2003).

Uma vez conhecida a atividade de CdtB restava a dúvida sobre quais seriam as funções de CdtA e CdtC. Já se sabia que quando CdtB era microinjetado nas células, mesmo que em pequenas concentrações, provocava um efeito devastador sobre a morfologia celular e sobre a cromatina, porém perdia completamente a atividade tóxica quando era posto em suspensão junto às células na ausência de CdtA e CdtC, significando que CdtA e CdtC possuem um papel na estabilidade da holotoxina, ou seja, fazem com que CDT consiga se ligar à célula alvo e ser internalizada, alcançando seu alvo (Lara-Tejero & Galán, 2001; Lee *et al.*, 2003). Resultados posteriores indicaram que CdtA e CdtC são requeridos para a entrada da subunidade ativa na célula alvo, inclusive com a entrada de CdtC junto com CdtB na célula e impedindo a progressão do ciclo celular mesmo em concentrações tão baixas quanto 40 ng/ml (Lara-Tejero & Galán, 2001; Akifusa *et al.*, 2005).

A função de CdtA é a menos conhecida até o momento. Ao que parece, ela é capaz de se ligar à célula alvo, mas isolada não apresenta atividade citotóxica; porém não se sabe se CdtA desempenha seu papel na holotoxina sob a forma completa de sua proteína ou se é necessário ser processada, atingindo o peso de 18 kDa (em *A. actinomycetemcomitans*), para ser ativada (Thelestam & Frisan, 2004).

2.6.1. HOMOLOGIAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE CDTB

As homologias entre diferentes proteínas de CdtA e de CdtC são sempre menores do que as homologias entre as proteínas CdtB (de Rycke & Oswald, 2001). Realizando um estudo filogenético de CdtB de várias espécies bacterianas, De Ricke e seu grupo encontraram que existe claramente quatro diferentes alelos de CdtB (de Rycke & Oswald, 2001).

A comparação da seqüência de aminoácidos de CdtB com estruturas tridimensionais conhecidas, usando um método de reconhecimento de enovelamento mostrou que CdtB é mais compatível com DNase I humana, Hap1 (endonuclease humana de reparo ao DNA), exonuclease III de *E. coli* e também com determinadas esfingomielinases (SMases) bacterianas e inositol fosfatases. O alinhamento de diferentes CdtBs mostrou a conservação de resíduos funcionalmente importantes, envolvido na ligação catalítica, na ligação de íons metálicos ou na ligação de substratos de várias difosfodiesterases tais como a DNase I humana e a esfingomielinase de *Bacillus cereus* (de Rycke & Oswald, 2001).

2.7. AÇÃO DE CDT EM CULTURAS DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Após a intoxicação das células por CDT, a divisão celular é interrompida, mas o citoplasma continua a crescer e distende a membrana plasmática resultando em células até cinco vezes acima de seu tamanho normal. As células intoxicadas mantêm a viabilidade ainda por algum tempo, no entanto, elas eventualmente mostram mudanças na cromatina como condensação e/ou fragmentação e, em último caso, morte (Lara-Tejero & Galán, 2000; Heywood *et al.*, 2005).

Examinando o conteúdo de DNA das células intoxicadas encontrou-se que estas são tetraplóides, fato que indica a parada na progressão celular na fase de divisão do material genético entre as duas células filhas, ou seja, entre as fases G2 e M do ciclo celular (Lara-Tejero & Galán, 2000).

A hipótese mais aceita sobre a parada do ciclo celular é a de que a toxina CDT, quando em suspensão no meio da cultura de células, só intoxica células que estejam passando pela fase S, a fase de síntese de DNA (de Rycke & Oswald, 2001).

Se CDT aparece somente como um entre os vários efetores bacterianos capazes de inibir a proliferação da célula eucariótica, sua originalidade reside em sua habilidade de provocar, em várias culturas primárias de células e linhagens celulares, um ponto de verificação fisiológico do ciclo celular em G2 (chamado cascata dos danos do DNA) similar àquele induzido por agentes prejudiciais ao DNA. Os pontos de verificação do ciclo celular são cascatas regulatórias complexas, altamente conservadas nas células eucarióticas, que controlam a ordem e o sincronismo de transições do ciclo celular e asseguram-se de que eventos críticos tais como a replicação do DNA e a segregação dos cromossomos estejam terminadas com fidelidade elevada (de Rycke & Oswald, 2001).

O bloqueio mitótico conduz a célula à morte dentro de três a cinco dias após a exposição à toxina, um período durante o qual as células continuam a sintetizar proteínas e crescem 10 vezes mais que as células controle (Pérès *et al.*, 1997).

Entretanto, os danos ao DNA podem conduzir à suspensão do ciclo celular em G2/M ou em G1/S, sendo que as diferenças nos pontos de checagem ativados dependem do tipo de célula em que a toxina é testada (Cortes-Bratti *et al.*, 2001).

Porém, pode acontecer de as células eucarióticas não paralisarem nem em G1 nem em G2. É o que acontece com linhagens de células linfoblastóides quando testadas com CDT de *H. ducreyi*; elas, ao invés de paralisarem seu ciclo celular, entram rapidamente em apoptose (Thelestam & Frisan, 2004).

Segundo Thelestam e Frisan (2004), as células não precisam estar em estado proliferativo para serem intoxicadas por CDT. Experimentos permitiram a observação de que as células dendríticas humanas (DCs) assim como fibroblastos primários de fetos humanos em falta de soro, ou seja, células que não estão em fase proliferativa são sensíveis a CDT. Isso contradiz as noções precedentes que as células necessitam passar com a fase de S para serem intoxicada. A análise do ciclo de células DCs humanas tratadas com CDT de *H. ducreyi* mostrou que todas as células do controle estavam em G0 ao passo que as células com toxinas depois que 24 horas permanecem em G0 ou se tornaram apoptóticas (Thelestam & Frisan, 2004).

Como já evidente pelo efeito morfológico, CDT afeta várias linhagens celulares com resultados diferindo dependendo do tipo celular. As células sensíveis incluem HEp-2, HeLa, CHO, Vero e os fibroblastos Don assim como as células de epitélio intestinal de embriões humanos (INT407), uma linhagem humana de células de carcinoma de cólon (Caco-2) e uma linhagem humana da queratinócitos (HaCat). As células humanas T CD4+ e CD8+ são altamente sensíveis a CDT de *A. actinomycetemcomitans*, que inibe também a proliferação da linhagem celular de hibridoma de células B murinas assim como as células do ligamento periodontal humanas e fibroblastos gengivais. Nos linfócitos, o efeito de CDT é um tanto diferente, pois nenhum aumento significativo no tamanho é observado e uma proporção das células morre por apoptose (de Rycke & Oswald, 2001).

O tratamento de células T humanas ativadas com CDT de *A. actinomycetemcomitans* (subunidade B purificada ou holotoxina recombinante) induziu a fragmentação do DNA entre 72 e 96 horas, a redução no tamanho de célula e aumento da condensação nuclear. As mudanças mitocondriais foram evidentes por uma diminuição no potencial transmembrana e uma elevação das espécies reativas de oxigênio (Thelestam & Frisan, 2004).

A CDT de *H. ducreyi* afeta as células endoteliais humanas normais (HUVEC), os queratinócitos e os fibroblastos do epitélio, fibroblastos embrionários do pulmão, células B humanas e as células dendríticas (Thelestam & Frisan, 2004).

A maioria das células testadas até o momento é sensível a CDT. Os poucos relatos de células resistentes a CDTs incluem as células Y-1 e os fibroblastos 3T3 de camundongo. A razão para sua resistência não é sabida, mas nestas células deve faltar um receptor de superfície necessário para a ligação da toxina (Thelestam & Frisan, 2004).

2.7.1. AÇÃO DE CDT SOBRE O DNA

Praticamente independente de alelo e de qual espécie é originária, a CDT provoca a degradação da dupla fita de DNA e quebra da cromatina; estes danos ao DNA e as respostas dos pontos de checagem do ciclo celular são idênticos aos provocados em células sob a ação de radiação ionizante (Thelestam & Frisan, 2004; Bielaszewska *et al.*, 2005). No entanto, onde ocorre a ligação e como se dá a quebra do DNA são questões ainda não respondidas.

Os danos ao DNA provocam uma série de processos cuidadosamente controlados que causam a suspensão do ciclo celular para assegurar que a divisão

da célula não prosseguirá para a fase seguinte até que os danos ao DNA estejam reparados (Lara-Tejero & Galán, 2000). A intoxicação das células e, conseqüentemente, a quebra do DNA induzem a expressão e fosforilação das histonas H2AX, um sensor nuclear de danos ao DNA que desempenha um papel crucial no recrutamento de complexos de reparo ao DNA para os locais onde ocorreram as rupturas no DNA dupla fita (Thelestam & Frisan, 2004; Bielaszewska *et al.*, 2005).

2.7.2. AÇÃO DE CDT SOBRE OS FILAMENTOS DE ACTINA

Outra ação de CDT sobre as células é a alteração no citoesqueleto, pois em algumas linhagens de células epiteliais, como CHO e Hep-2, viu-se que CDT provoca um rearranjo do citoesqueleto de actina (de Rycke & Oswald, 2001). Isto foi relatado para CDT-II de *E. coli* em células CHO, para CDT de *H. ducreyi* em células HEp-2/HeLa, fibroblastos Don de pulmão de hamster e fibroblastos de epitélio humanos, e recentemente também em células HeLa tratada com CDT de *Helicobacter cinaedi* (Thelestam & Frisan, 2004).

Após 48 horas de tratamento com a toxina, as fibras de stress de actina são prontamente visíveis. Após três ou quatro dias do tratamento, um período em que as células tratadas com CDT mostraram uma distensão celular óbvia, fibras de stress de actina são abundantes por todas as células tratadas com toxina, ao passo que em células não tratadas com CDT a disposição normal das fibras de actina é na periferia celular (Aragon *et al.*, 1997).

A distensão das células e a promoção de fibras de stress foram observadas também em células submetidas à radiação ionizante. Cabe observar que o tamanho

aumentado das células tratadas com CDT ou irradiadas não foi conectado à formação da fibra de stress, pois a inibição da formação de fibras do stress não afetou a distensão das células tratadas com CDT (Thelestam & Frisan, 2004).

2.8. AÇÃO DE CDT *IN VIVO*

O poderoso efeito antiproliferativo de CDT, observado *in vitro* em várias linhagens de células epiteliais e nas células imunes primárias, pode afetar prioritariamente o epitélio, que é caracterizado por uma renovação rápida das células e pela presença de numerosos de linfócitos intraepiteliais. Eventualmente, a falta da renovação do epitélio produz lesões epiteliais que alteram irreversivelmente a capacidade funcional dos tecidos ou que facilitam a invasão bacteriana de tecidos subjacentes. A inibição da ativação de linfócitos locais também diminui a capacidade do hospedeiro controlar a colonização e/ou prolongar a colonização local das bactérias, que são normalmente desprendidas junto com as células epiteliais a que estão ligadas. Do mesmo modo, a alteração profunda da célula pode conduzir a mudanças significativas na distribuição dos receptores da superfície da célula, possivelmente realçando a adesão e a invasividade de organismos bacterianos (de Rycke & Oswald, 2001).

Quase não há provas de que CDT sozinho seja responsável por doenças tanto em humanos quanto em animais. Algumas das evidências da ação de CDT *in vivo* são apresentadas a seguir:

Aragon e colaboradores, em 1997, isolaram das fezes de uma criança que sofria de gastroenterite e encefalopatia uma cepa produtora de CDT. O fato interessante é nenhum outro patógeno viral ou bacteriano foi isolado destas fezes e

nenhuma outra toxina ou fator de virulência conhecidos foram associados ao isolado de *E. coli*.

Em um outro experimento, quando a toxina CDT foi administrada a camundongo neonatos, em apenas quatro horas a diarreia se tornou evidente e, em exame mais aprofundado, detectou-se necrose do epitélio secretório do cólon (Aragon *et al.*, 1997). Entretanto, até agora não se observou *in vivo* os efeitos provocados em cultura de células de parada de ciclo celular e distensão das células epiteliais. Justamente por isso, alguns pesquisadores acreditam que é possível que a produção de CDT sozinho não tenha nenhuma implicação para a patogênese, mas sua produção por cepas de *E. coli* em combinação com outros fatores da virulência, tais como a habilidade de aderir à mucosa intestinal, pode ser significativo (Ghilard *et al.*, 2001).

Por fim, um fato que pode interferir nos experimentos de ação de CDT *in vivo* e gerar controvérsia é o de que nem todas as cepas que são CDT-positivas pela técnica de PCR, são produtoras de uma toxina citoletal distensora ativa em linhagens celulares (Friederich *et al.*, 2006).

2.8.1. CDT E CÂNCER

Já é de conhecimento do meio científico que indivíduos que se tornam carreadores de *Salmonella typhi*, a causadora da febre tifóide, passam a ter um risco 200 vezes maior de desenvolver um carcinoma hepatobiliar quando comparados com indivíduos que tiveram febre tifóide aguda e que não são carreadores da bactéria (Lax, 2005).

Como as toxinas bacterianas podem estar envolvidas na carcinogênese através do dano ao DNA por ataque enzimático, por reações inflamatórias que produzem radicais livres ou por afetarem os mecanismos de reparo, algumas toxinas (incluindo CDT) interferem na sinalização, resultando em quebra do balanceamento do crescimento, da divisão celular e da apoptose, podendo levar ao desenvolvimento de tumores (Lax, 2005).

Sendo assim, talvez este aspecto carcinogênico de se ser portador de *S. typhi* se deva ao fato de ela possuir o gene *cdtB* (desacompanhado de *cdtA* e *cdtC*), que é expresso quando a bactéria já está no meio intracelular e, então, é secretada diretamente no citoplasma da célula hospedeira, podendo promover toda a sorte de danos típicos de CDT (Lax, 2005).

2.9. PESQUISAS SOBRE CDT EM HUMANOS E ANIMAIS E ALIMENTOS

No Brasil, foi descrita a produção de CDT em amostras de *E. coli* isoladas de humanos (Guth *et al.*, 1994; Ghilardi *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2003). Em suínos, foi relatado pelo nosso grupo que 22,4% das amostras de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia neonatal apresentaram o gene *cdtB* (Silva & Leite, 2002).

Estudos apontam *E. coli* produtoras de CDT como causa de mortalidade em pássaros (Foster *et al.*, 1998). Tóth *et al.* (2000) relatou que dentre 204 cepas de *E. coli* isoladas de leitões pós-desmame, duas apresentaram gene da CDT. Pesquisando os alelos *cdt-I*, *cdt-II* e *cdt-III* em amostras de origem humana e de bovinos, Clark *et al.* (2002) observaram que o genótipo *cdt-I* foi preferencialmente mais freqüente em amostras de *E. coli* que carrega os genes do fator citotóxico necrotizante 1 (*cnf1*), enquanto o gene *cdt-III* foi mais encontrado em amostras *cnf2*

e que o genótipo *cdt-III* foi mais prevalente em isolados animais enquanto *cdt-I* e *cdt-II* em isolados humanos.

Recentemente, Rosario *et al.* (2004) descreveram que 10% das cepas de *E. coli* isoladas de ovos, embriões e pintos com infecção no saco vitelínico apresentaram o gene da CDT. Outras variantes, incluindo *cdt-IV*, foram relatadas entre cepas de *E. coli* produtoras de CNF.

Pesquisando a presença do gene de CDT na coleção de *E. coli* verotoxigênica (VTEC) do Laboratório de Referência de *E. coli* (LREC), da Universidade de Santiago de Compostela (Espanha), e nas cepas isoladas pela COLIRED-O157¹, Leite D.S. (comunicação pessoal) obteve dados que revelaram que das 1.693 cepas de VTEC estudadas, 80 (4,7%) foram positivas para CDT. Dentre estas, 79 (98,7%) apresentaram o alelo III e apenas uma o alelo IV. A origem predominante foi bovina, com 59 cepas (73,7%), seguida por 13 cepas isoladas de carne moída (16,2%), quatro cepas (5,0%) isoladas de água residual e apenas três cepas isoladas de ovinos (3,7%). Este estudo revelou que independente da origem geográfica do isolado, no caso das cepas bovinas, o alelo III da CDT foi prevalente, estando presente nas cepas isoladas na Espanha, Suíça, Argentina e Brasil.

No estudo realizado com cepas de *E. coli* isoladas de humanos pela COLIRED-O157 foi observado que dentre 200 cepas analisadas, 30 (15,0%) foram positivas para *cdt* e, dentre essas, foram encontrados os quatro alelos pesquisados. O alelo I foi o mais prevalente sendo encontrado em 11 (36,6%) cepas, o segundo

¹**COLIRED-O157:** Projeto "Patogênese, diagnóstico e tipagem molecular de *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC) O157:H7 e outros sorotipos" da Rede Temática de Investigação Cooperativa do Ministério de Saúde e Consumo Espanhol, Fundo de Investigação Sanitária e Instituto de Saúde Carlos III, coordenada pelo Prof. Dr. Jorge Blanco, diretor do Laboratório de Referência de *E. coli* (LREC).

alelo prevalente foi o alelo III, detectado em nove (30,0%) cepas, em terceiro o alelo IV, com oito (26,6%) cepas e por último, o alelo II, detectado em duas (6,6%) cepas. Foi observada forte associação de CDT com o gene *eae*. Vinte e seis cepas (86,6%) apresentaram ambos os genes. É interessante destacar que todos os alelos apresentaram forte associação com o gene *eae*, a saber: alelo I (11/11 cepas), II (2/2), III (6/9) e IV (7/8 cepas) (Leite D.S., dados não publicados).

Recentemente, Bouzari *et al.* (2005) relataram que *cdt* foi detectado em 37,5% das amostras de *E. coli* de diferentes patótipos: EPEC, ETEC, EAEC, VTEC e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC).

Em 2006, Kadhum e seus colaboradores empreenderam uma busca em bovinos, suínos e ovinos por cepas portadoras de CDT e de CNF em carcaças (150 amostras, no total), em carne moída fresca (50 amostras, no total) e em hambúrgueres congelados (50 amostras, no total). Como resultado final obteve-se que 30 cepas eram portadoras de CDT e/ou CNF, sendo quatro portadoras de CNF1, duas portadoras de CNF2/CDT-III, 15 portadoras de CDT-I, quatro de CDT-III e cinco de CDT-IV. Das 30 cepas, três foram isoladas de carne moída e as outras 27 eram provenientes das carcaças de bovinos, suínos e ovinos. Apesar de ainda ser incerta a habilidade de causar doença em humanos por parte destas cepas carreadoras destas toxinas, a presença destes isolados em alimentos apresenta uma possível fonte de infecção aos humanos (Kadhum *et al.*, 2006).

3. FILOGENIA DE *E. coli*

3.1. OS GRUPOS FILOGENÉTICOS A, B1 B2 E D DE *E. coli*

A coleção de referência de *E. coli* (ECOR), composta de 72 cepas de diversas origens naturais, é tida como representante da diversidade genética da espécie (Ochman & Selander, 1984). Caracterizando estas cepas quanto à habilidade de fermentação de alguns açúcares, mobilidade em ágar, atividade da enzima ornitina descarboxilase e quanto ao padrão de migração eletroforética de 35 enzimas, foram definidos por Selander *et al.* (1987) os quatro grupos filogenéticos de *E. coli* atualmente conhecidos (A, B1, B2, D). Concluindo que o grupo A compreende cepas isoladas, em sua maior parte, de humanos; o grupo B1 era formado por cepas isoladas de mamíferos não-primatas; e cepas do grupo B2 foram isoladas principalmente de humanos e outros primatas (Selander *et al.*, 1987). Neste trabalho não foram tecidos comentários a respeito do grupo D.

No início dos estudos de filogenia e *E. coli*, os grupos filogenéticos não tinham ligação com patogenicidade, a correlação entre filogenia de *E. coli* e patogenicidade começou a ser feita só em 1998 com Boyd & Hartl, que estudaram a distribuição filogenética de quatro determinantes de virulência (*hly*, *kps*, *pap* e *sfa*). Os quatro determinantes de virulência ficaram confinados a predominantemente dois grupos (B2 e D) com eventuais ocorrências em A e B1.

Muitos determinantes de virulência têm sido associados principalmente aos grupos B2 e D. O maior número de determinantes está associado ao B2, sendo muitos fatores de virulência implicados na infecção extra-intestinal de indivíduos não imunocomprometidos. Poucos determinantes de virulência têm sido associados aos

grupos A e B1, sendo considerados compostos por cepas comensais e patógenos oportunistas (Boyd & Hartl, 1998; Lecointre *et al.*, 1998; Picard *et al.*, 1999; Bonacorsi *et al.*, 2000).

Ainda há divergências sobre qual é o grupo mais ancestral dentro de *E. coli* e duas diferentes hipóteses são defendidas por pesquisadores. A primeira hipótese é a de que as cepas patogênicas são derivadas de cepas comensais e adquiriram operons de virulência cromossômicos e extra-cromossômicos (Escobar-Páramo *et al.*, 2004). Com base nesta hipótese o grupo A é considerado ancestral e o B2, o mais derivado.

A segunda hipótese é a de que o grupo B2 é o mais ancestral e os pesquisadores adeptos desta hipótese explicam que o grupo A sempre aparece como primeiro a emergir da árvore de *E. coli* por ser arbitrariamente colocado na árvore como grupo ancestral ou pela falta de grupo externo na confecção da árvore (Lecointre *et al.*, 1998). Em um trabalho realizado em 1998 por Lecointre e colaboradores, o grupo B2 foi o primeiro a emergir seguido pelo grupo D, sendo que este é grupo irmão do clado que contém A e B1 e neste clado A é o grupo irmão de B1.

Em 2000, Bonacorsi e colaboradores realizaram um extenso estudo que buscava marcadores genéticos para os quatro grupos filogenéticos, resultando em três regiões específicas para *E. coli* causadora de meningite neonatal. Clermont *et al.* (2000), usando dois dos marcadores encontrados por Bonacorsi e um gene encontrado no seqüenciamento do genoma da *E. coli* K-12 (Blattner *et al.*, 1997), desenvolveram uma técnica de determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli* baseada na amplificação por PCR destas três seqüências. Estas três seqüências

são: *chuA*, um gene necessário para o transporte do grupo heme da hemoglobina na *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, *yjaA*, um gene inicialmente identificado no seqüenciamento da *E. coli* K-12 cuja função é desconhecida e um fragmento anônimo de DNA designado por TspE4.C2 (Clermont *et al.*, 2000). Com o resultado das reações de amplificação foi possível estabelecer uma árvore dicotômica para o agrupamento filogenético (Figura 1).

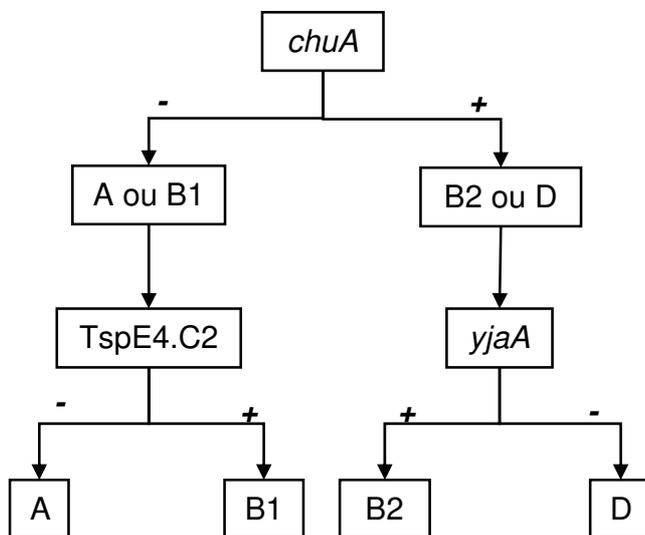


Figura 1: Esquema proposto por Clermont *et al.* (2000) para classificação filogenética.

3.2. PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS OU PFGE

Desde 1984, quando Schwartz e Cantor introduziram a técnica do *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (ou gel de eletroforese de campo pulsado), esta tem sido importante na análise de genomas de procariotos e eucariotos. Atualmente, o PFGE é a técnica que mais satisfaz as necessidades dos laboratórios em se tratando de tipagem bacteriana (Tenover *et al.*, 1995).

A técnica de PFGE é mais dispendiosa em termos financeiros e de tempo que o ERIC-PCR (*PCR of Enterobacterial repetitive intergenic consensus* – PCR das seqüências consenso repetitivas intergênicas de enterobactérias). No entanto, PFGE é mais confiável que ERIC-PCR no quesito reprodutibilidade intra e interexperimental, uma vez que apenas umas poucas bandas fortes, insuficientes para a tipagem, se mantêm na amplificação de ERIC e as bandas fracas de uma amostra, que seriam as encarregadas reais pela definição da tipagem nem sempre são amplificadas em dois experimentos distintos e nem mesmo quando a mesma amostra é colocada várias vezes dentro de um mesmo experimento (Meacham *et al.*, 2003).

Como PFGE é usado, em sua maior parte, para tipagem bacteriana, uma importante função desta técnica é a tentativa de identificar as possíveis fonte e a rota da infecção de um patógeno. Sendo assim, a eletroforese de campo pulsado foi empregada em muitas investigações epidemiológicas de surtos esporádicos e múltiplos (Iguchi *et al.*, 2002). O padrão de restrição do DNA analisado é comparado com outro para determinar o parentesco. Geralmente não são estabelecidos critérios para a análise dos padrões de restrição, até mesmo pelo fato de ainda não ter sido criada uma biblioteca internacionalmente padronizada de padrões de PFGE como ocorre, por exemplo, com a fagotipagem para O157. Conseqüentemente o mesmo resultado de PFGE pode ter interpretações diferentes (Tenover *et al.*, 1995; Saari *et al.*, 2001).

Em 1995, Tenover e colegas propuseram um guia de métodos para interpretar os padrões de restrição de DNA gerados em PFGE, no entanto, este só deve ser aplicado na análise de pequenos grupos de isolados (geralmente, 30 amostras ou

menos) e o critério proposto só é confiável caso o PFGE resolva pelo menos dez fragmentos distintos, pois quando um número menor de bandas é observado, a habilidade discriminatória do critério é diminuída (Tenover *et al.*, 1995).

Em amostras bacterianas, são consideradas geneticamente indistinguíveis à cepa do surto aquelas que apresentarem o padrão de restrição com o mesmo número de bandas e estas com o mesmo peso molecular. A interpretação epidemiológica desse resultado indica que os isolados são da mesma cepa (Tenover *et al.*, 1995).

As amostras bacterianas são consideradas estreitamente relacionadas quando os padrões de PFGE diferem devido a mudanças decorrentes de um único evento genético como mutação de ponto, deleção ou inserção de DNA, criando ou abolindo um sítio cromossômico de restrição e resultando na formação de duas ou três bandas diferentes (Tenover *et al.*, 1995).

Um isolado é considerado possivelmente relacionado à cepa do surto se seu padrão de PFGE diferir do padrão do surto por dois eventos genéticos independentes gerando de quatro a seis bandas diferentes (Tenover *et al.*, 1995).

E os isolados bacterianos são considerados não relacionados quando o padrão de PFGE difere por mudanças consistentes com três ou mais eventos genéticos independentes resultando, geralmente, em sete ou mais bandas diferentes e tipicamente com menos de 50% das bandas coincidentes (Tenover *et al.*, 1995).

3.2.1. ESTUDOS DE *E. COLI* USANDO PFGE

Alguns trabalhos já foram realizados determinando a diversidade genética em grupos de cepas de *E. coli* através do PFGE (Adachi *et al.*, 2001; Keskimaki *et al.*,

2001; Kahali *et al.*, 2004; Beutin *et al.*, 2005). Beutin e colaboradores (2005), por exemplo, encontraram grandes diferenças dentro de um grupo de cepas O103, indicando que cepas pertencentes ao mesmo sorogrupo O podem ter evoluído separadamente umas das outras e que o sorogrupo O em si não deve ser tomado por indicador de relações genéticas entre as cepas de *E. coli*.

OBJETIVOS

1. GERAL

Estudar cepas de *Escherichia coli* portadoras dos alelos da toxina citoletal distensora.

2. ESPECÍFICOS

- Determinar a presença do alelo V de CDT dentre as amostras CDT-III;
- Caracterizar filogeneticamente as cepas CDT-positivas através do método descrito por Clermont *et al.* (2000);
- Utilizando a técnica de PFGE, determinar a diversidade genética das cepas pertencentes aos sorotipos O91:H21, O113:H21 e O116:H21.

MATERIAL E MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS

Foram utilizadas 80 cepas de *Escherichia coli* isoladas de bovinos, ovinos, humanos, água e carne. As cepas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Jorge Blanco, do LREC e depositadas na coleção do Laboratório de Antígenos Bacterianos II, do Departamento de Microbiologia e Imunologia (Tabela 1).

As cepas identificadas somente com números seguidas por uma letra (24210a, por exemplo) foram isoladas de humanos diarréicos durante a coleta de amostras para a COLIREC-O157. As cepas identificadas por letras seguidas de números (FV907 ou VTB380, por exemplo) foram isoladas de animais diarréicos (bovinos e ovinos) ou durante pesquisa por contaminação por *E. coli* em carne e água.

1.1. MANUTENÇÃO E CRESCIMENTO DAS CEPAS

As cepas foram mantidas em meio composto por ágar nutriente e caldo nutriente. Para os experimentos, as bactérias foram cultivadas em meio TSA (Tryptic Soy Agar) ou TSB (Tryptic Soy Broth) e incubadas *over night* em estufa a 37°C.

2. EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO

O DNA bacteriano foi extraído por fervura, segundo técnica descrita por Blanco *et al.* (1997).

Tabela 1: Cepas de *E. coli* isoladas de humanos, animais e alimentos e seus respectivos sorotipos.

cepa	sorotipo	Fonte	Origem	cepa	sorotipo	Fonte	Origem	cepa	sorotipo	Fonte	Origem
20358a	O178:H6	Humano	Espanha	FV965b	O91:H21	Carne	Argentina	FV4994	O86:H-	Bovino	Suíça
21288b	O113:H21	Humano	Espanha	FV967a	ONT:H8	Carne	Argentina	FV4995	O86:H-	Bovino	Suíça
21485a	O113:H21	Humano	Espanha	FV967b	O22:H8	Carne	Argentina	VTB006	O116:H-	Bovino	Espanha
24210a	O2:H27	Humano	Espanha	FV967g	O22:H8	Carne	Argentina	VTB076	O22:H8	Bovino	Espanha
31696a	O111:H10	Humano	Espanha	FV969	O116:H21	Carne	Argentina	VTB081	O91:H21	Bovino	Espanha
31696f	O18:H7	Humano	Espanha	FV971a	ONT:H16	Carne	Argentina	VTB131	O91:H21	Bovino	Espanha
31923a	O181:H-	Humano	Espanha	FV2683	O7:H10	Bovino	Brasil	VTB186	O116:H21	Bovino	Espanha
32410a	O85:H43	Humano	Espanha	FV2690	O132:H-	Bovino	Brasil	VTB187	O116:H21	Bovino	Espanha
34136a	O128:H-	Humano	Espanha	FV2711	ONT:H11	Bovino	Brasil	VTB188	O116:H21	Bovino	Espanha
34136b	ONT:H4	Humano	Espanha	FV2713	O119:H-	Bovino	Brasil	VTB201	O91:H21	Bovino	Espanha
35144c	O139:H2	Humano	Espanha	FV2731	ONT:H-	Bovino	Brasil	VTB227	O116:H21	Bovino	Espanha
35267c	O85:H-	Humano	Espanha	FV2814	O39:H21	Bovino	Brasil	VTB255	O116:H21	Bovino	Espanha
37159a	O109:H-	Humano	Espanha	FV2829	O55:H-	Bovino	Brasil	VTB282	O116:H21	Bovino	Espanha
42584a	O128:H-	Humano	Espanha	FV2830	O55:H-	Bovino	Brasil	VTB290	ONT:H32	Bovino	Espanha
46887a	O156?:H4	Humano	Espanha	FV3574	O20:H19	Bovino	Argentina	VTB300	O113:H21	Bovino	Espanha
51113a	O56:H-	Humano	Espanha	FV3587	O91:H21	Bovino	Argentina	VTB325	O123:H16	Bovino	Espanha
53199a	ONT:H45	Humano	Espanha	FV3592	O91:H21	Bovino	Argentina	VTB380	O167:H21	Bovino	Espanha
57775a	ONT:H4	Humano	Espanha	FV4085	O121:H10	Ovino	Suíça	VTB393	O116:H21	Bovino	Espanha
00190/04a	OND	Humano	Espanha	FV4116	O162:H7	Água	Espanha	VTB396	O116:H21	Bovino	Espanha
28410/04a	OND	Humano	Espanha	FV4132	O98:H?	Água	Espanha	VTB404	O123:H16	Bovino	Espanha
B10	O91:H21	Bovino	Espanha	FV4140	O113:H21	Água	Espanha	VTB415	O113:H21	Bovino	Espanha
B45	O104:H21	Bovino	Espanha	FV4144	O91:H21	Água	Espanha	VTF021	O64:H5	Carne	Espanha
FV907	O116:H21	Bovino	Argentina	FV4765	O11:H-	Bovino	Brasil	VTF025	O113:H21	Carne	Espanha
FV915	O113:H21	Bovino	Argentina	FV4773	O11:H-	Bovino	Brasil	VTF035	O64:H5	Carne	Espanha
FV917a	O20:H19	Bovino	Argentina	FV4776	O22:H16	Bovino	Brasil	VTF037b	O88:H8	Carne	Espanha
FV961a	O20:H19	Carne	Argentina	FV4791	O103:H21	Bovino	Brasil	VTO286	O55:H2	Ovino	Espanha
FV963	O8:H16	Carne	Argentina	FV4976	O117:HNR	Bovino	Suíça				

3. REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

3.1. GENES *CDT*, *VT*, *EAE*, *CHUA*, *YJAA* E FRAGMENTO *TSPE4.C2*

3.1.1. PREPARO DA REAÇÃO

Para um volume final de 30 µl foram utilizados 3,0 µl de tampão para PCR 10x concentrado, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, a quantidade necessária de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 2, página 40), 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas), 3 µl de DNA e água MilliQ esterilizada para completar o volume de 30 µl.

3.1.2. PROGRAMAÇÃO DO TERMOCICLADOR

O termociclador usado para a amplificação dos genes e fragmento de DNA desejados foi o *GeneAmp PCR System 9700 – PE Applied Biosystems*. Na Tabela 2 (página 40) estão listados a temperatura, o tempo de anelamento da reação de amplificação e a concentração dos oligonucleotídeos usados nas reações. Após o término das reações os tubos foram mantidos a 4°C.

3.1.3. VISUALIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO

Os resultados das reações foram visualizados pela aplicação de 10 µl do produto de amplificação em gel horizontal de agarose a 1,5% em tampão TAE (Tris-HCl 2 M, ácido acético 40 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0). Para a eletroforese foi aplicada a corrente de 100 V (4 V/cm) por 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado durante 15 minutos em solução de brometo de etídio (1 µg/mL), visualizado em transluminador de luz UV e fotografado para arquivo. Como marcador de peso molecular foram usados os padrões

de *GeneRuler 100 bp DNA ladder*, *GeneRuler 1 kb DNA ladder* (Fermentas) ou *1 kb DNA ladder* (Gibco BRL), dependendo da disponibilidade.

4. ESTUDOS FILOGENÉTICOS

4.1. ESTUDO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS A, B1, B2 E D

A análise filogenética das cepas de *E. coli* foi realizada conforme descrito por Clermont *et al.* (2000) utilizando reações de PCR. Foi usado um par de iniciadores para cada gene (*chuA* e *yjaA*) ou fragmento de DNA desejado (TspE4.C2) (Tabela 2, página 40). O esquema proposto (Figura 1, página 29) permitiu a classificação das cepas nos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D.

Usou-se como padrões positivos de *chuA* as cepas J96 e O157:H7; para *yjaA* foram usadas as cepas DH5 α , K-12 e C600 e para TspE4.C2 somente a cepa 2348/69 foi usada como controle positivo.

Tabela 2: Genes, temperatura de anelamento e tamanho dos produtos (em pares de base) utilizados na detecção de CDT, confirmação de VT e *eae* presentes e na classificação filogenética.

Genes	Alelos	Oligonucleotídeos		Tamanho	Anelamento		[oligos]	Referência
					Temperatura	Tempo		
CDT	Multiplex	S1	GAAAATAAATGGAATATAAATGTCCG	469 pb	62°C	1 min	30 pmol	Tóth <i>et al.</i> , (2003)
		AS1	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA					
		S2	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG					
		AS2	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA					
	Alelos I e IV	1-4 - F	ATGAATGAGTATATCTGGAATAC	246 pb	56°C	1 min	30 pmol	Blanco, M. Comunicação pessoal
		1-4 - R	ATGCATGGGTTGAGAAGAAAA					
	Alelos II e III	2-3 - F	TCAACGGCTGTAGATACAGGTA	274 pb	55°C	1 min	30 pmol	
		2-3 - R	TGTGCAGTGAAAAATG					
	Alelo I	1 - F	GGCAGTACCAGCTTCTGCAACGT	276 pb	60°C	1 min	30 pmol	
		1 - R	TGAATCCACGCCCGATTTC					
	Alelo II	2 - Fd	AATCCCTATCCCTGAACC	542 pb	60°C	1 min	30 pmol	Sonntag <i>et al.</i> , 2005
		2 - Rd	GTTCTATTGGCTGTGGTG					
	Alelo III	3 - R	GACTGGGTCTCGGCTGTCACGA	324 pb	64°C	1 min	30 pmol	Blanco, M. Comunicação pessoal
		2-3 - F	TCAACGGCTGTAGATACAGGTA					
	Alelo IV	4 - F	TTCAATACCATCTTCAGCTACAC	281 pb	56°C	1 min	30 pmol	
		4 - R	AGAATCTATACCTCGGTTG					
Alelo V-A	5A - F	AGCATTAAATAAAAGCACGA	1329 pb	52°C	1 min	30 pmol	Bielaszewska <i>et al.</i> , 2004	
	5A - R	TACTTGCTGTGGTCTGCTAT						
Alelo V-C	5C - F	GTCAACGAACATTAGATTAT	748 pb	47°C	1 min	30 pmol		
	5C - R	ATGGTCATGCTTTGTTATAT						

Tabela 2 (cont.)

Genes	Alelos	Oligonucleotídeos		Tamanho	Anelamento		[oligos]	Referência
					Temperatura	Tempo		
Filogenia	<i>chuA</i>	<i>chuAF</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279 pb	55°C	30 s	30 pmol	Clermont <i>et al.</i> , 2000
		<i>chuAR</i>	TGCCGCCAGTACCAAAGACA					
	<i>yjaA</i>	<i>yjaAF</i>	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	211 pb	55°C	30 s	30 pmol	
		<i>yjaAR</i>	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC					
	TspE4.C2	TspE4.C2F	GAGTAATGTGCGGGCATTCA	152 pb	55°C	30 s	30 pmol	
		TspE4.C2R	CGCGCCAACAAAGTATTACG					
VT	VT1	VT1F	CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC	302 pb	53°C	1 min	30 pmol	Blanco <i>et al.</i> , 2004
		VT1R	CGTGGTATAGCTACTGTCACC					
	VT2	VT2F	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	516 pb	53°C	1 min	30 pmol	
		VT2R	CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC					
Intimina	<i>eae</i>	<i>eaeF</i>	GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG	384 pb	60°C	1 min	30 pmol	
		<i>eaeR</i>	GGCGCTCATCATAGTCTTTC					

4.2. ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÔMICA USANDO PFGE

4.2.1. PREPARO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS EM BLOCOS DE AGAROSE

As amostras presentes na Tabela 3 foram semeadas em 3 mL de meio TSB (Tryptic Soy Broth) e incubadas *over night* a 37°C sob agitação de 150. Em seguida, as culturas foram diluídas na proporção de 1:50 em 6 mL de TSB e incubadas novamente a 37°C sob agitação até atingirem densidade óptica (O.D.) de 0,6 (600 nm).

Ao atingir a O.D. desejada, 3 mL da amostra foram centrifugados a 5000 rpm (centrífuga Sorvall MC 12) por 4 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 500 µl de tampão de suspensão de células (100 mM Tris, pH 7,4; 20 mM NaCl e 100 mM EDTA).

O passo seguinte foi misturar 500 µL de agarose *low melting point* (Gibco BRL) 2% (feita com TBE 1x) à temperatura de 50°C a cada amostra e transferi-las para os moldes próprios de preparo dos blocos de agarose contendo DNA. Para o endurecimento dos blocos de agarose, estes foram deixados por 15 minutos à temperatura ambiente e por mais 15 minutos a 4°C.

Tabela 3: Os sorotipos e cepas estudados.

Sorotipo	Cepas	Sorotipo	Cepas	Sorotipo	Cepas
O91:H21	B10	O113:H21	21288b	O116:H21	FV907
	FV965b		21485a		FV969
	FV3587		FV915		VTB186
	FV3592		FV4140		VTB187
	FV4144		VTB300		VTB188
	VTB081		VTB415		VTB227
	VTB131		VTF025		VTB255
	VTB201				VTB282
		VTB393			
		VTB396			

4.2.2. TRATAMENTO DOS BLOCOS DE AGAROSE

Os blocos foram transferidos para tubos de 15 mL novos e estéreis contendo solução de lise (5 mL de solução de suspensão de células acrescidos de 1mg/mL de lisozima) e incubados a 37°C por 2 horas. Após esse tempo, os blocos foram transferidos para 5 mL de solução de desproteínização (250 mM EDTA, pH 9,0; 0,5% sarcosil e 1 mg/mL proteinase K) e incubados por cerca de 16 horas a 50°C. Após essa incubação, foram feitas quatro lavagens de 30 minutos cada com tampão TE 10x (1 M Tris e 10 mM EDTA, pH 8,0) nos blocos para retirar o sarcosil e a proteinase K.

4.2.3. DIGESTÃO DO DNA CONTIDO NOS BLOCOS

Após a última lavagem com TE 10x foram feitas duas lavagens de 30 minutos cada com TE 1x (100 mM Tris e 1 mM EDTA, pH 8,0), a fim de equilibrar a concentração de sais no interior do bloco e permitir a atividade da enzima de restrição.

Em seguida, os blocos foram transferidos para tubos esterilizados de 1,5 mL contendo 267 µL de água MilliQ, 30 µL do tampão 10x, 3 µL de BSA e 2,7 µL da

enzima *XbaI* (~40,5 U de enzima – Amersham Pharmacia Biotech) e incubados por 4 horas em estufa a 37°C.

4.2.4. CORRIDA ELETROFORÉTICA

Os blocos, imediatamente após o término da digestão, foram colocados em gel de agarose 1% (*DNA Typing Grade Agarose* – Life Technologies) preparado com tampão TBE 0,5x (45 mM Tris-borato e 1 mM EDTA) juntamente com o padrão *Lambda Ladder PFG Marker* (New England Biolabs) no primeiro e último poço do gel. Os blocos foram selados com uma fina camada de agarose normal 1% preparada com tampão TBE 0,5x e, posteriormente, o gel foi submetido à corrida em um programa de dois blocos no aparelho *CHEF-DRII System (Contour Clamped Homogeneous Electric Field)* (BioRad) sob as condições de corrida eletroforética descritas na Tabela 4, baseadas em Yatsuyanagi *et al.* (2002). Para a corrida foi utilizado o tampão TBE 0,5x e a temperatura foi mantida a 14°C.

Tabela 4: Condições de corrida eletroforética usadas no PFGE.

Bloco	Voltagem	Tempo de corrida	Pulso	
			inicial	final
1	6 V/cm	11 horas	4 segundos	8 segundos
2	6 V/cm	9 horas	8 segundos	50 segundos

Após a corrida, o gel foi corado por 30 minutos em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml), observado em transluminador de luz UV e registrado com o software Liscap (Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

4.2.5. ANÁLISE DE DADOS

A análise dos géis de PFGE foi realizada no software Gel Compar II (Applied Maths, Inc., Texas) e os dendrogramas foram gerados através do uso do índice de similaridade de Dice, seguindo o método utilizado por Giammanco *et al.* (2002).

RESULTADOS

1. FONTE, ORIGEM E SOROTIPOS DAS CEPAS DE *E. COLI*

Fazendo uma análise inicial da Tabela 1 (página 37) através do agrupamento das cepas estudadas quanto à fonte (animal ou alimento do qual foi isolada a cepa), quanto à origem (país em que ocorreu a coleta e o isolamento) e sorotipos a que pertencem, são obtidos três grupos de resultados mesmo antes de se fazer uma análise mais acurada.

No levantamento das fontes de isolamento das cepas chega-se aos seguintes números: 42 das 80 cepas (52,5%) foram isoladas de bovinos, 20 cepas (25,0%) foram isoladas de humanos, 12 cepas foram isoladas de carne (15,0%), quatro foram isoladas de água (5,0%) e duas cepas foram isoladas de ovinos, correspondendo a 2,5% das cepas estudadas. Estes dados estão demonstrados graficamente na Figura 2.

Analisando a Tabela 1 quanto à origem das cepas, tem-se que 50 (62,5%) cepas foram isoladas na Espanha, 14 (17,5%) são originárias da Argentina, 11 cepas (15,0%) provêm do Brasil e quatro cepas (5,0%) foram isoladas na Suíça (Figura 3).

Quando se leva em conta os sorotipos, vê-se que as 80 cepas estão distribuídas em 46 sorotipos diferentes, porém é nítida a dominância dos sorotipos O116:H21 (10 cepas), O91:H21 (8 cepas) e O113:H21 (7 cepas) que, juntos, equivalem a 31,3% do total das cepas. Na Tabela 5 estão listados todos os sorotipos presentes neste estudo, assim como o número de cepas pertencentes a cada um deles.

Tabela 5: Sorotipos e número de cepas de cada sorotipo.

Sorotipos	Nº de cepas	Sorotipos	Nº de cepas	Sorotipos	Nº de cepas
O2:H27	1	O86:H-	2	O132:H-	1
O7:H10	1	O88:H8	1	O139:H2	1
O8:H16	1	O91:H21	8	O156?:H4	1
O11:H-	2	O98:H?	1	O162:H7	1
O18:H7	1	O103:H21	1	O167:H21	1
O20:H19	3	O104:H21	1	O178:H6	1
O22:H16	1	O109:H-	1	O181:H-	1
O22:H8	3	O111:H10	1	OND	2
O39:H21	1	O113:H21	7	ONT:H-	1
O55:H-	2	O116:H-	1	ONT:H11	1
O55:H2	1	O116:H21	10	ONT:H16	1
O56:H-	1	O117:HNR	1	ONT:H32	1
O64:H5	2	O119:H-	1	ONT:H4	2
O85:H-	1	O121:H10	1	ONT:H8	1
O85:H43	1	O123:H16	2	ONT:H45	1
		O128:H-	2		

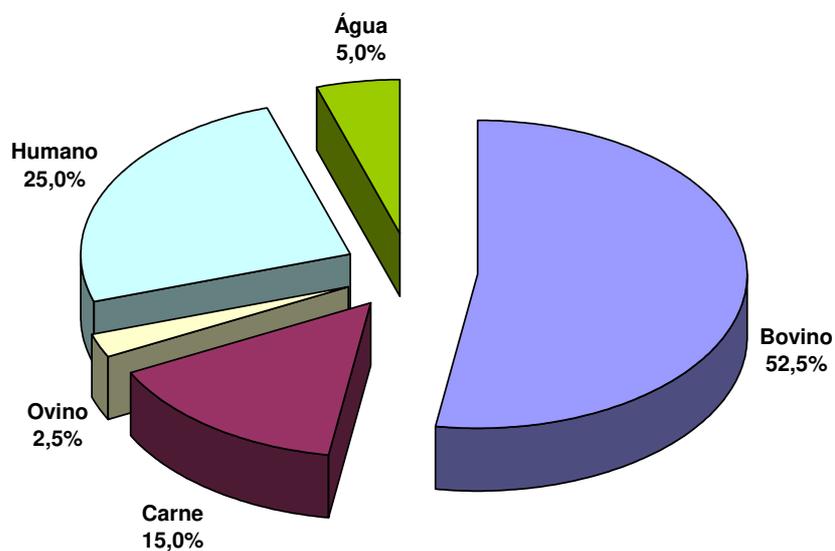


Figura 2: Distribuição das cepas quanto à fonte de que foram isoladas.

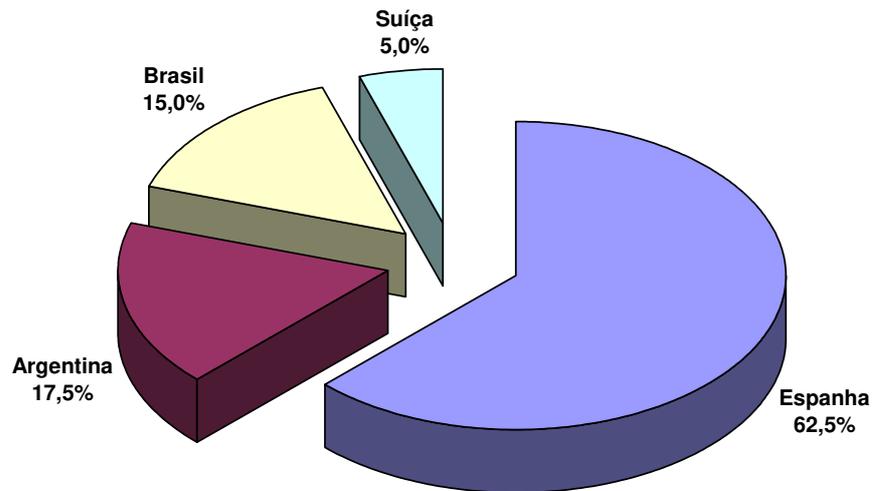


Figura 3: Distribuição das cepas bacterianas quanto ao país de origem.

2. CDT

Com os dois pares de oligonucleotídeos desenhados por Tóth *et al.* (2003), para um sistema multiplex, foi feita a confirmação da presença do gene de CDT. Após a confirmação, através da observação de um amplificado de 469 pb (Figura 4A), as cepas de *E. coli* já identificadas como CDT-positivas foram submetidas a ensaios para a determinação do alelo de CDT através de reações de PCR com um conjunto de nove pares de oligonucleotídeos, descritos na Tabela 2 (página 40).

As cepas foram testadas com os oligonucleotídeos “alelos I-IV” e “alelos II-III”, que identificam se as cepas possuem os alelos I/IV ou alelos II/III, respectivamente. Os amplicados destes dois pares de oligonucleotídeos correspondem a 246 e 274 pb, respectivamente (Figura 4B e C).

O passo seguinte foi realizar, nas 12 cepas que amplificaram com o par “alelos I-IV”, as reações específicas para CDT-I e CDT-IV chegando, então, ao resultado

final do alelo presente nas cepas. O amplificado correspondente às cepas CDT-I foi de 276 pb e o das CDT-IV tem o tamanho de 281 pb (Figura 5A e D, respectivamente).

No caso das 68 cepas positivas na reação com os oligonucleotídeos iniciadores para os “alelos II-III”, cada cepa foi testada com os oligonucleotídeos responsáveis pela identificação dos alelos II e III de CDT. A cepa CDT-II positiva produziu um amplificado de 542 pb e o amplificado de 324 pb identificou provisoriamente o restante das cepas como CDT-III (Figura 5B e C, respectivamente).

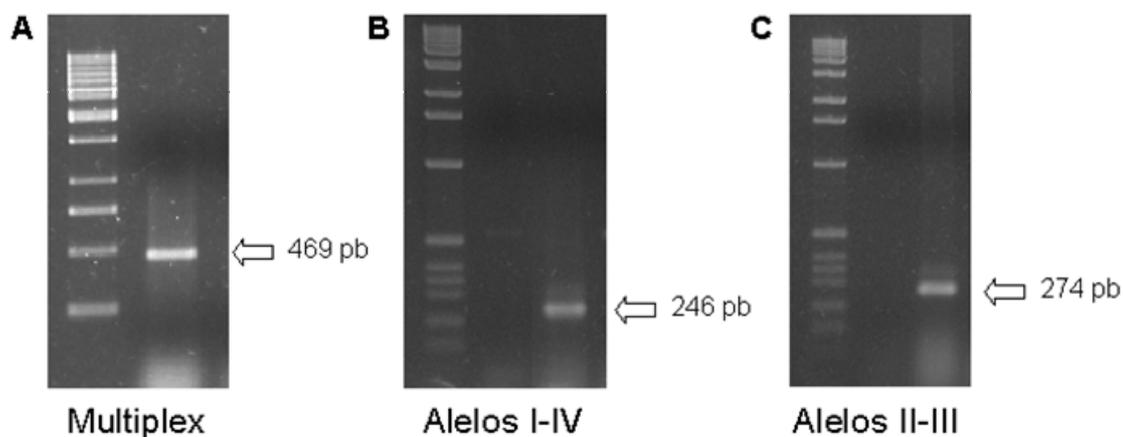


Figura 4: Perfil eletroforético dos amplificadas das reações multiplex e de identificação de alelos I/IV e II/III de CDT. Os padrões de pesos moleculares usados foram *Gene Ruler 1 kb DNA ladder* (Fermentas - Figura 4A) e *1 kb DNA ladder* (Gibco BRL - Figura 4B e C).

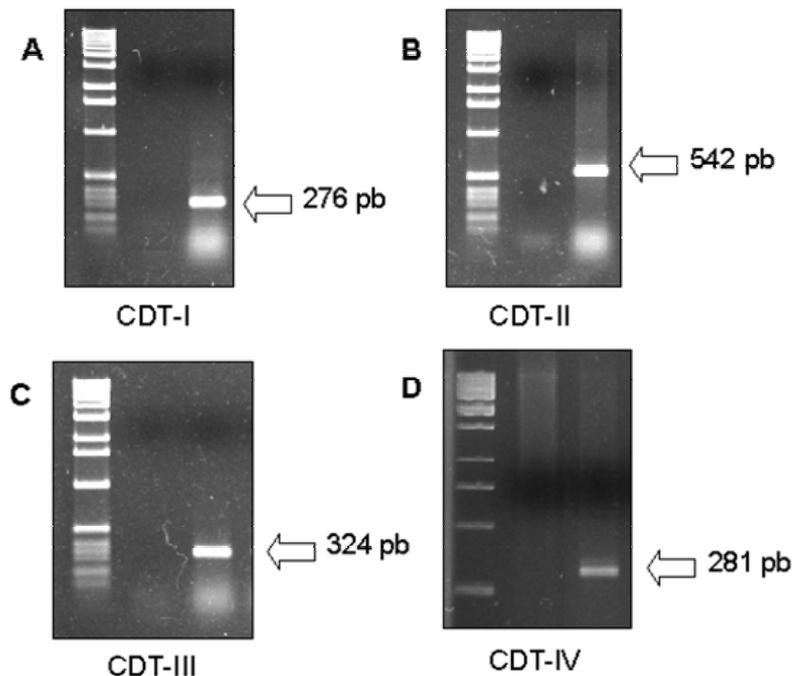


Figura 5: Perfil eletroforético dos alelos de CDT I a IV. A, amplificado do alelo I de CDT (276 pb); B, amplificado de CDT-II com 542 pb; C, amplificado de CDT-III com 324 pb; D, amplificado de CDT-IV, com 281 pb. Padrões de peso molecular utilizados foram Gene Ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas - Figura 5D) e 1kb DNA ladder (Gibco BRL – Figura 5A, B e C).

2.1. CEPAS PORTADORAS DO ALELO CDT-V

As cepas inicialmente identificadas como CDT-III foram submetidas a reações de PCR com os oligonucleotídeos para *cdtA* e *cdtC* do alelo V (Tabela 2, página 40).

Trinta e sete cepas produziram os amplificados de 1329 e 748 pb demonstrados na Figura 6, requisito para serem classificadas como CDT-V; na Tabela 6 estão listadas todas as cepas CDT-V assim como seus sorotipos, fontes e origens. As outras 30 cepas não apresentaram as bandas citadas, sendo então classificadas como CDT-III.

É interessante notar que todas as cepas pertencentes aos sorotipos O91:H21, O113:H21 e O116:H21, os mais importantes do grupo de cepas estudadas, foram classificadas como CDT-V (Tabela 6).

A distribuição final dos alelos de CDT nas cepas passou a ser de oito cepas CDT-I (10,0%), uma cepa CDT-II (1,3%), 30 CDT-III (37,5%), quatro CDT-IV (5,0%) e 37 cepas CDT-V (46,3%). A Figura 7 ilustra a distribuição dos alelos de CDT nas cepas estudadas.

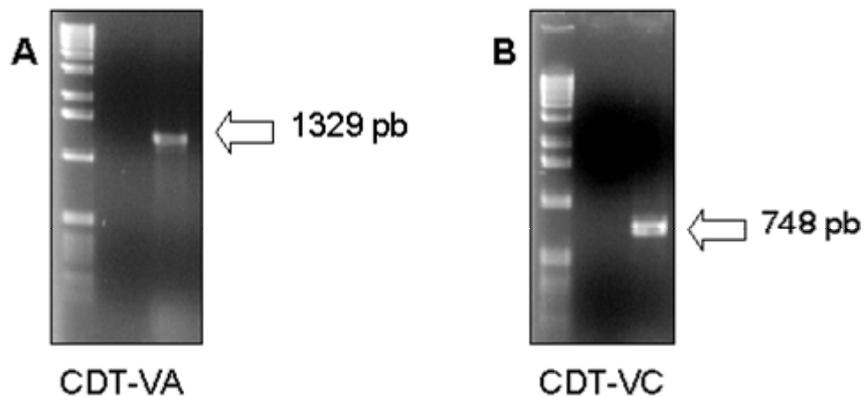


Figura 6: Perfil eletroforético de *cdtA* e *cdtC* de CDT-V. Em A observa-se o amplificado de *cdtA* do alelo V de CDT e em B, o amplificado de *cdtC* de CDT-V. O padrão de peso molecular utilizado foi *1 kb DNA ladder* (Gibco BRL).

Tabela 6: Cepas CDT-V organizadas quanto ao sorotipo a que pertencem.

Cepas	Sorotipo	Fonte	Origem
FV967a	ONT:H8	Carne	Argentina
FV917a	O20:H19	Bovino	Argentina
FV961a	O20:H19	Carne	Argentina
FV4776	O22:H16	Bovino	Brasil
FV967b	O22:H8	Carne	Argentina
FV967g	O22:H8	Carne	Argentina
VTB076	O22:H8	Bovino	Espanha
B10	O91:H21	Bovino	Espanha
FV965b	O91:H21	Carne	Argentina
FV3587	O91:H21	Bovino	Argentina
FV3592	O91:H21	Bovino	Argentina
FV4144	O91:H21	Água	Espanha
VTB081	O91:H21	Bovino	Espanha
VTB131	O91:H21	Bovino	Espanha
VTB201	O91:H21	Bovino	Espanha
FV4791	O103:H21	Bovino	Brasil
B45	O104:H21	Bovino	Espanha
21288b	O113:H21	Humano	Espanha
21485a	O113:H21	Humano	Espanha
FV915	O113:H21	Bovino	Argentina
FV4140	O113:H21	Água	Espanha
VTB300	O113:H21	Bovino	Espanha
VTB415	O113:H21	Bovino	Espanha
VTF025	O113:H21	Carne	Espanha
VTB006	O116:H-	Bovino	Espanha
FV907	O116:H21	Bovino	Argentina
FV969	O116:H21	Carne	Argentina
VTB186	O116:H21	Bovino	Espanha
VTB187	O116:H21	Bovino	Espanha
VTB188	O116:H21	Bovino	Espanha
VTB227	O116:H21	Bovino	Espanha
VTB255	O116:H21	Bovino	Espanha
VTB282	O116:H21	Bovino	Espanha
VTB393	O116:H21	Bovino	Espanha
VTB396	O116:H21	Bovino	Espanha
FV4085	O121:H10	Ovino	Suíça
46887a	O156?:H4	Humano	Espanha

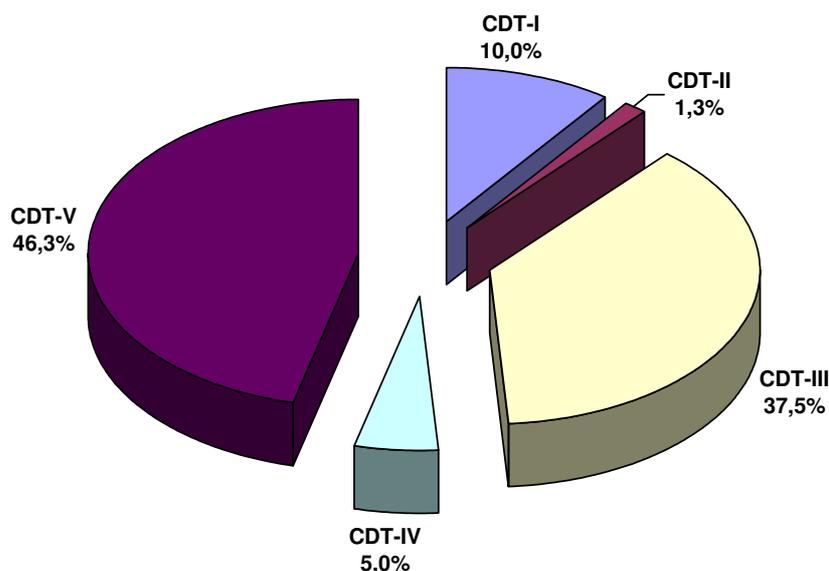


Figura 7: Distribuição dos alelos de CDT nas cepas estudadas.

3. FATORES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS

Apesar de, antes do início deste estudo, as cepas já terem sido caracterizadas para a presença ou não dos genes da verotoxina e da intimina, as reações de PCR foram refeitas para promover a confirmação dos dados anteriores.

3.1. CONFIRMAÇÃO DE VT

As 80 cepas foram submetidas a reações de PCR usando os oligonucleotídeos “VT1” e “VT2” (Tabela 2, página 40). Como resultado, obteve-se que 32 cepas amplificaram os 516pb de VT2 (40,0%), 21 produziram o amplificado de 302 pb, demonstrando possuírem o gene de VT1 (26,3%), 13 cepas (16,3%) carregam ambos os genes em seus genomas e 14 cepas (17,5%) não são verotoxigênicas (Figura 8). Na Figura 9 pode-se observar os perfis de migração eletroforética de VT1 e de VT2.

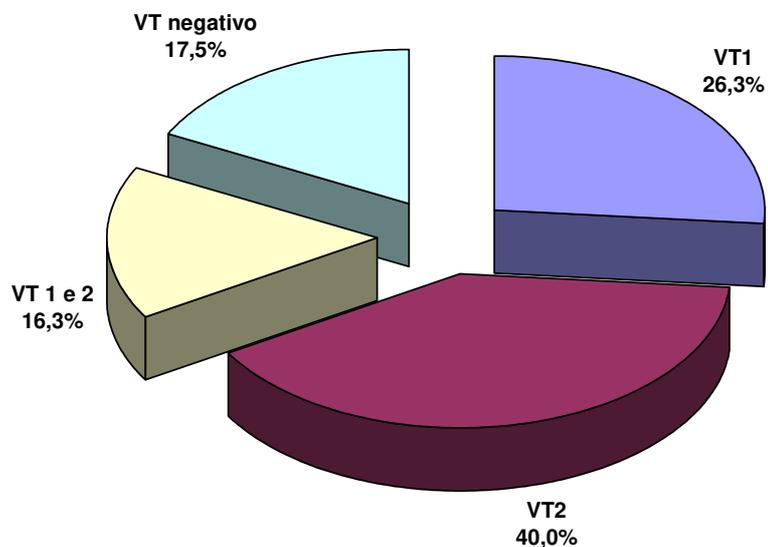


Figura 8: Ocorrência, em porcentagem, dos genes da verotoxina dentre as cepas estudadas.

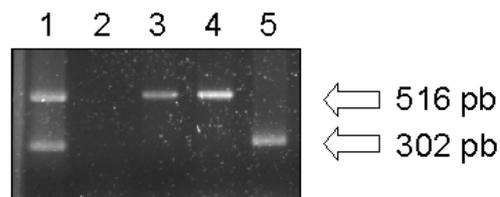


Figura 9: Perfis eletroforéticos dos amplificadores de VT. Canaleta 1, cepa positiva para VT1 e VT2 (cepa B45); canaleta 2, cepa VT-negativa (cepa 42584a); canaletas 3 e 4 cepas VT2 positivas (cepas 24210a e VTF025); e a canaleta 5 está representado uma cepa VT1 (28410/04a).

3.2. CONFIRMAÇÃO DE *EAE*

Do mesmo modo foi feita a confirmação da presença do gene da intimina nas cepas estudadas, obtendo o resultado de que apenas 19 cepas (23,8%) amplificaram a banda de 384 pb esperada para *eae* (Figura 10).

Os dados obtidos para VT e *eae* e submetidos à confirmação foram corroborados após os ensaios confirmatórios, não havendo alteração dos resultados obtidos anteriormente.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios confirmatórios de VT e *eae* observou-se 61 cepas (76,3%) VTEC, 13 cepas EPEC atípicas (16,3%), cinco cepas (6,3%) EHEC e uma cepa EPEC típica (1,3%) (dados não mostrados).

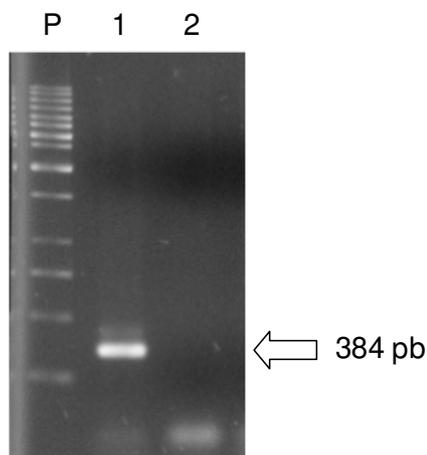


Figura 10: Perfil eletroforético do produto de amplificação de *eae*. P, padrão de peso molecular utilizado foi *GeneRuler 1 kb DNA ladder* (Fermentas); canaleta 1, cepa FV4085; canaleta 2, cepa FV4116.

4. FILOGENIA ECOR SEGUNDO CLERMONT *ET AL.* (2000)

4.1. CONTROLES PARA *CHUA*, *YJAA* E TspE4.C2

O primeiro passo para a realização do estudo filogenético foi a obtenção dos controles positivos e negativos para as reações de PCR. Foram testadas duas amostras de DH5 α e de O157:H7 (EHEC), uma de K-12 e sua cepa relacionada C600, uma de J96 (UPEC) e uma de 2348/69 (EPEC). Na Figura 11, pode-se observar que DH5 α , K-12 e C600 amplificam somente o gene *yjaA*; O157:H7, J96 e 2348/69 amplificam os genes *chuA* e *yjaA* e somente a cepa 2348/69 amplificou o fragmento TspE4.C2. Seguindo a árvore dicotômica de Clermont *et al.* (2000) (Figura 1, página 29), tem-se que as cepas DH5 α , K-12 e C600 são pertencentes ao grupo filogenético A e que as cepas O157:H7, J96 e 2348/69 são pertencentes ao B2, compatível com o fato das primeiras serem conhecidas como não patogênicas e das últimas serem sabidamente patogênicas.

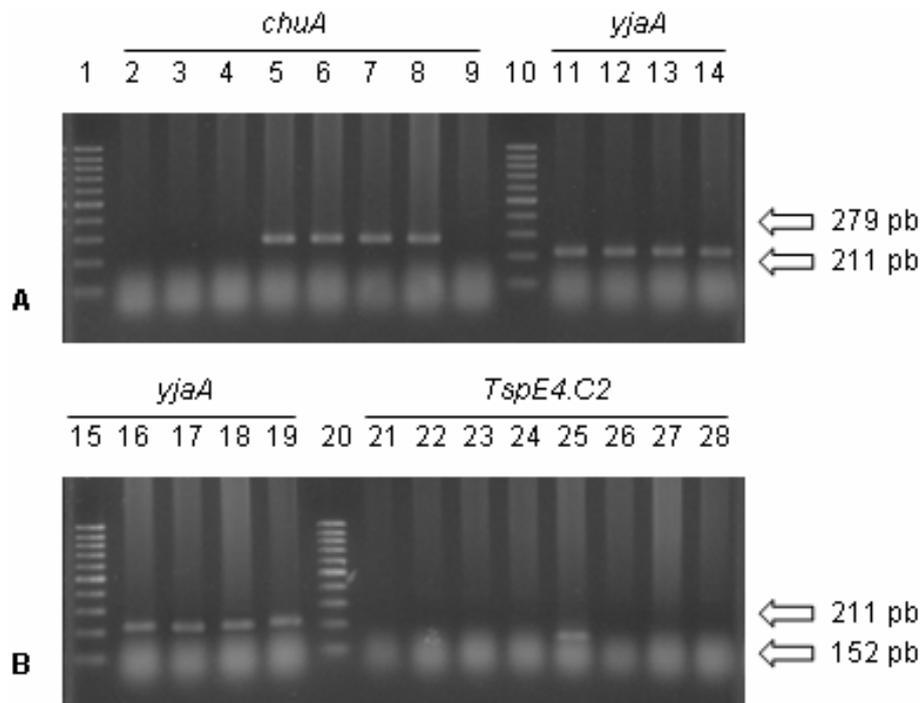


Figura 11: Determinação dos controles usando cepas patogênicas e não patogênicas. Canaletas 1, 10, 15 e 20: *GeneRuler 100 bp DNA ladder* (Fermentas); de 2 a 9: *chuA*; de 11 a 14 e 16 a 19: *yjaA*; 21 a 28: *TspE4.C2*; canaletas 2, 3, 11, 12, 21 e 22: cepas DH5 α ; canaletas 4, 13 e 23: cepa K-12; canaletas 5, 14 e 24: cepa J96; canaletas 6, 16 e 25: cepa 2348/69; 7, 8, 17, 18, 26 e 27: cepas O157:H7 e canaletas 9, 19 e 28: cepa C600.

4.2. PCR DE *CHUA*, *YJAA* E *TSP E4.C2* E OS GRUPOS FILOGENÉTICOS

Das 80 amostras, 28 amplificaram o gene *chuA*, 22 amplificaram o gene *yjaA* e 63 amplificaram o fragmento *TspE4.C2*. Com base nestes dados, pôde-se determinar a classificação filogenética das cepas de acordo com Clermont *et al.* (2000) (Tabela 7).

A distribuição nos grupos filogenéticos das cepas estudadas pode ser observada na Figura 12. Do total de cepas, sete cepas (8,8%) pertencem ao grupo A,

45 cepas (56,3%) pertence ao grupo B1, 15 cepas (18,8%) pertencem ao grupo B2 e 13 cepas (16,3%) pertencem ao grupo D (Figura 12).

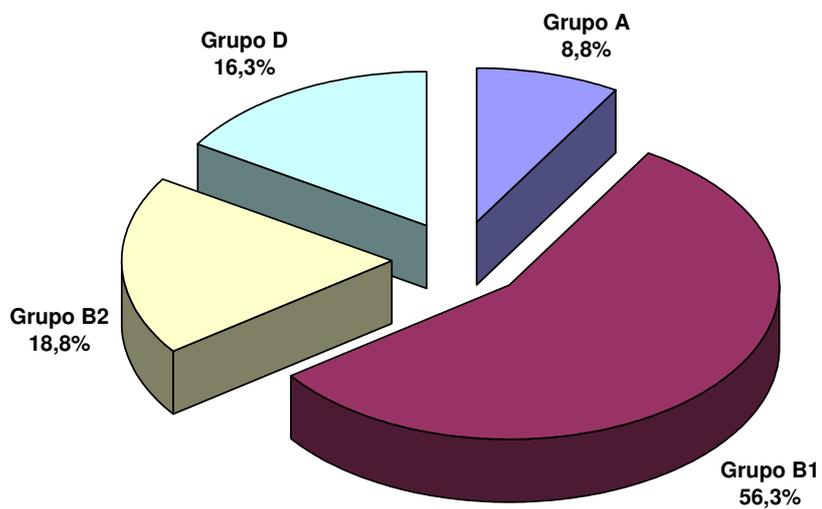


Figura 12: Distribuição das cepas nos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D.

Tabela 7: Grupos filogenéticos das 80 cepas segundo Clermont *et al.* (2000) e os fatores de virulência associados.

Cepas	CDT	VT	eae	Grupo filogenético	cepas	CDT	VT	eae	Grupo filogenético	cepas	CDT	VT	eae	Grupo filogenético
24210a	IV	2	-	A	FV4085	V	2	+	B1	20358a	IV	-	+	B2
35267c	I	-	+	A	FV4116	III	2	-	B1	31696f	I	-	+	B2
46887a	V	-	+	A	FV4140	V	2	-	B1	32410a	III	-	+	B2
53199a	I	-	+	A	FV4144	V	2	-	B1	34136b	IV	-	+	B2
FV4994	III	1	-	A	FV4791	V	1 e 2	-	B1	35144c	IV	1 e 2	+	B2
FV4995	III	1	-	A	FV4976	III	1	-	B1	37159a	III	-	+	B2
VTB325	III	1	-	A	VTB006	V	2	-	B1	57775a	I	-	+	B2
					VTB076	V	2	-	B1	00190/04a	I	-	+	B2
21288b	V	2	-	B1	VTB081	V	2	-	B1	28410/04a	III	1	-	B2
21485a	V	2	-	B1	VTB131	V	2	-	B1	B10	V	2	-	B2
31696a	I	1 e 2	+	B1	VTB186	V	2	-	B1	FV4132	III	2	-	B2
51113a	I	-	+	B1	VTB187	V	2	-	B1	VTB380	III	1	-	B2
B45	V	1 e 2	-	B1	VTB188	V	2	-	B1	VTF021	III	1	-	B2
FV907	V	2	-	B1	VTB201	V	2	-	B1	VTF035	III	1	-	B2
FV915	V	2	-	B1	VTB227	V	2	-	B1	VTF037b	III	2	-	B2
FV917a	V	1 e 2	-	B1	VTB255	V	2	-	B1					
FV961a	V	1 e 2	-	B1	VTB282	V	2	-	B1	31923a	II	-	+	D
FV963	III	1	-	B1	VTB300	V	2	-	B1	34136a	III	-	+	D
FV965b	V	2	-	B1	VTB393	V	2	-	B1	42584a	III	-	+	D
FV967a	V	1 e 2	-	B1	VTB396	V	2	-	B1	FV2690	III	1	-	D
FV967b	V	1 e 2	-	B1	VTB404	III	1	-	B1	FV2711	III	1	+	D
FV967g	V	1 e 2	-	B1	VTB415	V	2	-	B1	FV2731	III	1	-	D
FV969	V	2	-	B1	VTF025	V	2	-	B1	FV2814	III	1 e 2	-	D
FV971a	III	1	-	B1	VTO286	III	1	-	B1	FV2829	III	1	-	D
FV2683	I	1 e 2	+	B1						FV2830	III	1	-	D
FV2713	III	1	-	B1						FV4765	III	1	-	D
FV3574	III	1 e 2	-	B1						FV4773	III	1	-	D
FV3587	V	2	-	B1						FV4776	V	1 e 2	-	D
FV3592	V	2	-	B1						VTB290	III	1	-	D

+: presença do gene; -: ausência do gene.

4.3. GRUPOS FILOGENÉTICOS, ALELOS DE CDT E OUTROS FATORES DE VIRULÊNCIA

Na análise conjunta dos grupos filogenéticos, dos alelos de CDT, dos tipos de VT e de *eae* pode-se observar que:

O maior grupo, B1, foi composto por 45 cepas. Nestas cepas o alelo V de CDT foi o mais freqüente, sendo observado em 34 cepas (75,6%). O alelo III foi observado em oito cepas (17,8%) e o alelo I em apenas três cepas (6,7%). Quanto à presença do gene da verotoxina, observou-se que VT2 foi mais freqüente, presente, isoladamente, em 28 cepas (62,2%) e em mais 10 cepas (22,2%) em associação com VT1 e somente em seis cepas (13,3%) observou-se VT1. Ainda neste grupo, observou-se apenas quatro cepas (8,9%) com o gene *eae*.

No segundo grupo, B2, composto por 15 cepas, observou-se o alelo III de CDT em oito cepas (53,3%), os alelos I e IV foram observados em três cepas cada (20,0% cada) e o alelo V em apenas uma cepa (6,7%). Quanto à presença de VT, sete cepas (46,7%) foram negativas, quatro cepas (26,7%) foram VT1, três cepas (20,0%) VT2 e uma cepa (6,7%) VT1 e 2. É interessante destacar que o gene *eae* foi detectado em oito cepas (53,3%) desse grupo.

O terceiro grupo, D, foi composto por 13 cepas; dentre estas, o alelo III de CDT foi detectado em 11 cepas (84,6%). Os alelos II e IV foram observados em uma cepa cada (7,7% para cada alelo). O gene para VT1 foi detectado em 10 (76,9%) das cepas, sendo que em duas estava associado ao VT2; não foi observado neste grupo cepas positivas para apenas VT2. O gene *eae* foi observado em quatro cepas (30,8%) deste grupo.

O menor dos grupos, o grupo A, foi composto por sete cepas. Neste pequeno conjunto de cepas foi observado que o alelo III de CDT estava presente em três cepas (42,9%), o alelo I em duas (28,6%) e os alelos IV e V em uma cepa cada (14,3% cada). O gene para VT1 foi observado em três cepas (42,7%), o gene para VT2 em uma (14,3%) e três cepas foram negativas (42,7%). O gene *eae* foi observado em três cepas (42,7%).

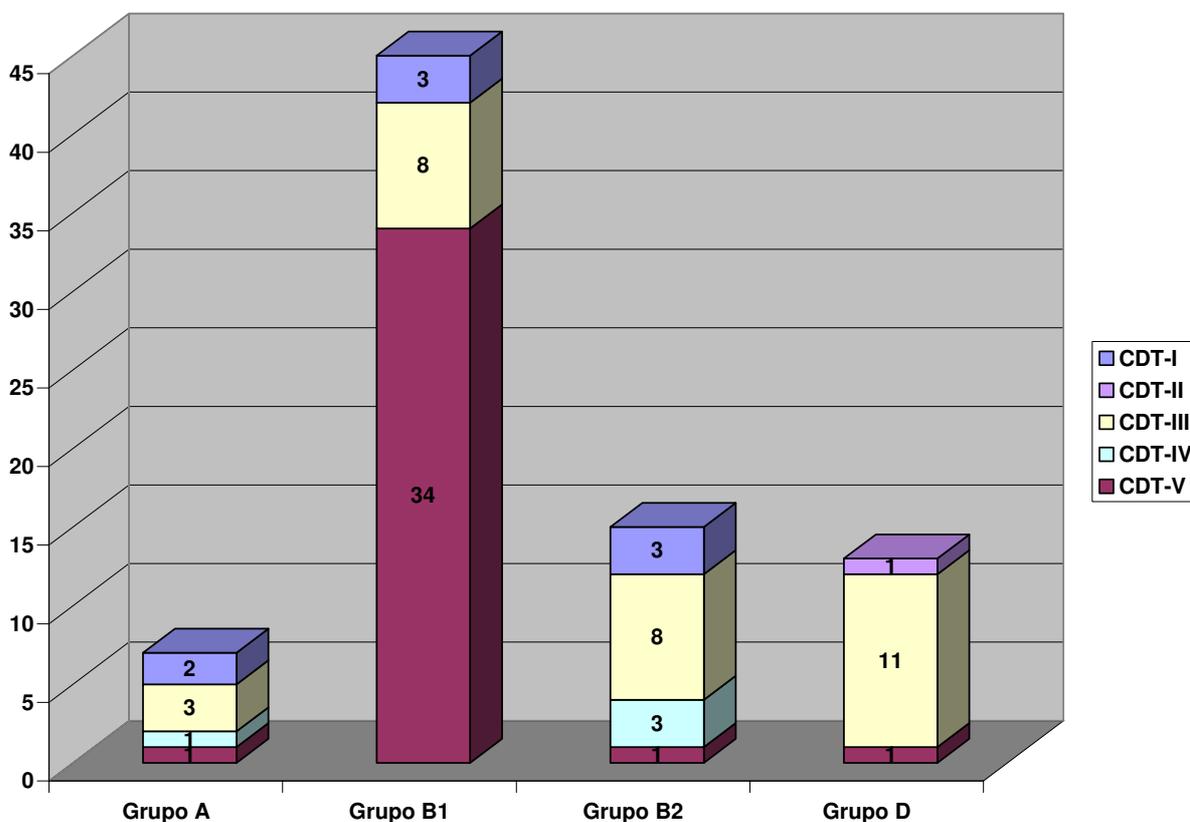


Figura 13: Alelos de CDT em cada grupo filogenético. O número observado no interior de cada coluna representa a quantidade de amostras.

Quando se analisa separadamente as cepas isoladas pela COLIRED-O157 e as cepas VTEC são obtidos dados muito interessantes, por exemplo:

Nas 20 cepas da COLIRED-O157 estão presentes todos os alelos de CDT, havendo predominância do alelo CDT-I (7 cepas – 35,0%). Os outros alelos estão distribuídos da seguinte forma: CDT-III com cinco cepas (25,0%), CDT-IV, com quatro cepas (20,0%), CDT-V, com três cepas e, por fim, o único representante de CDT-II (5,0%) (Figura 14).

Vale destacar que 16 das 19 cepas portadoras de *eae* estão neste grupo e apenas seis cepas possuem os alelos 1 e/ou 2 da verotoxina, estando, portanto, todas as EPEC típica e atípicas presentes dentre as 20 cepas deste grupo.

Com relação ao agrupamento filogenético, há maior número de cepas B2 (9 cepas – 45%), seguido pelos grupos A e B1 com 4 cepas cada um (20,0% cada) e D, que reuniu apenas três cepas (15,0%).

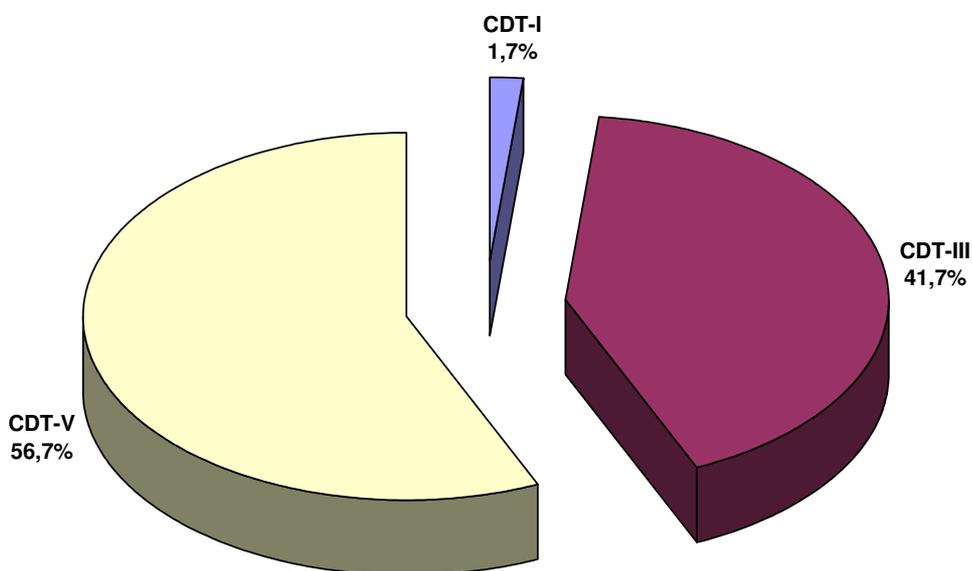


Figura 14: Distribuição dos alelos de CDT dentro do grupo de cepas humanas isoladas pela COLIRED-O157.

Analisando as cepas VTEC tem-se que, à exceção da cepa FV2683, que carrega o alelo I de CDT, todas as outras 59 cepas se distribuem entre os alelos III e V, com 34 cepas (56,7%) para CDT-V e 25 cepas (41,7%) para CDT-III (Figura 15).

Separando as cepas em grupos formados pelas que possuem somente VT1, VT2 e ambos os alelos, é possível observar que todas as 20 cepas VT1 também são CDT-III, apenas uma possui *eae* e todas são negativas para o gene da enterohemolisina (*ehly*) e positivas para *cnf2* (dados não mostrados); com relação aos grupos filogenéticos, vê-se que 11 cepas pertencem aos grupos B2 e D (3 cepas B2 e 8 cepas D - 27,2% e 72,7%, respectivamente).

O grupo formado pelas 29 cepas VT2 é basicamente composto por CDT-V, sendo as exceções feitas pelas cepas FV4116, FV4132 e VTF37b, que são CDT-III; para completar esta quase uniformidade das cepas VT2 há o fato de que 25 cepas são *eae*-negativas, 23 possuem *ehly* e 24 são negativas para *cnf2* (dados não mostrados). Quanto ao agrupamento filogenético, observa-se que apenas duas cepas são B2, sendo todo o restante pertencente ao grupo B1; curiosamente as cepas B2 (FV4132 e VTF37b) são também as que desviam do padrão sendo CDT-III.

Nas cepas 11 VT1 e 2 pode-se observar que há oito cepas CDT-V, duas CDT-III e uma CDT-I; *eae*, *ehly* e *cnf2* também têm suas exceções, sendo nove *ehly*-positivas, duas *cnf2*-positivas e apenas uma cepa *eae*-positiva (dados não mostrados). Avaliando os grupos filogenéticos, vê-se que todas as cepas são B1, à exceção de duas que pertencem ao grupo D.

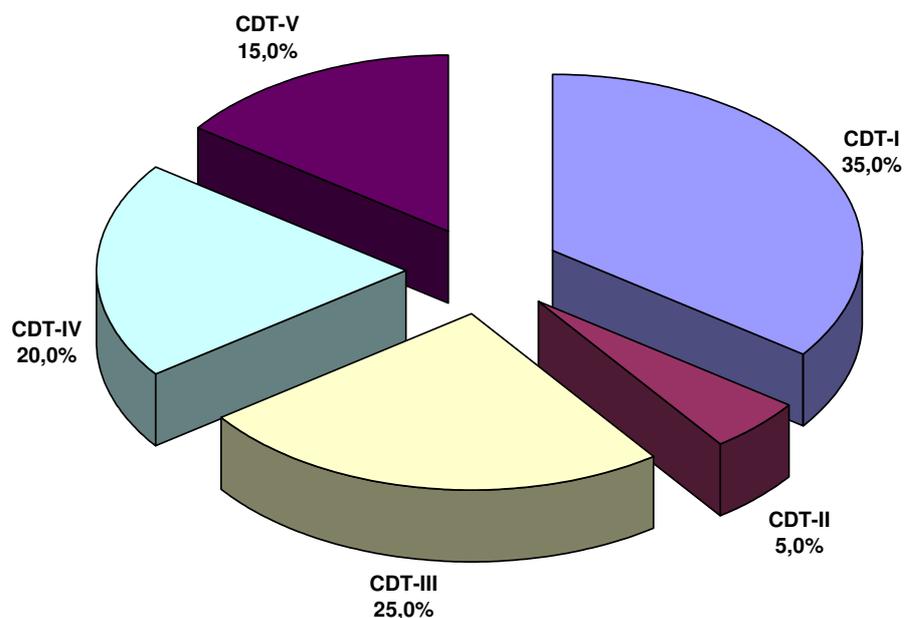


Figura 15: Distribuição dos alelos de CDT dentro do grupo de cepas VTEC.

4.4. GRUPOS FILOGENÉTICOS, FONTES E ORIGENS DAS CEPAS

No grupo A, há quatro cepas isoladas de humanos (57,1%) e três cepas isoladas de bovinos (42,7%). O grupo B1 é o mais diverso em número de fontes, sendo composto por 27 cepas isoladas de bovinos (60,0%), nove isoladas de carne (20,0%), quatro isoladas de humanos (8,9%), três cepas isoladas de água (6,7%) e outras duas isoladas de ovinos (4,4%) (Figura 16).

No grupo B2, os humanos respondem por nove cepas (60,0%), bovinos por duas (13,3%), carne por três (20,0%) e água é representada por somente uma cepa (6,7%). Por fim, no grupo D houve somente isolados de humanos (três cepas – 23,1%) e de bovinos (10 cepas – 76,9%) (Figura 16).

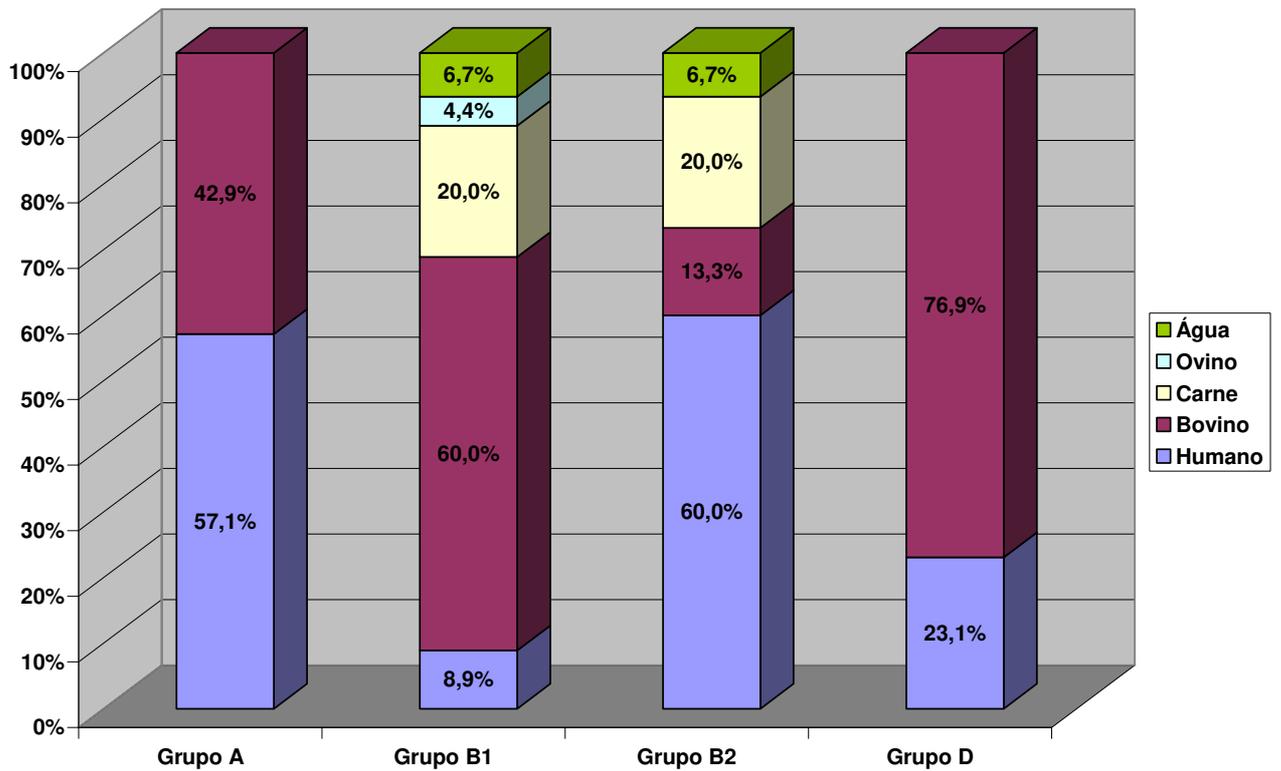


Figura 16: Fontes das cepas em cada grupo filogenético.

4.5. SOROTIPOS O91:H21, O113:H21, O116:H21

As cepas pertencentes aos sorotipos O91:H21, O113:H21, O116:H21 (Tabela 8) são todas pertencentes ao grupo B1 exceto a cepa B10 (O91:H21), que pertence ao grupo B2.

Com relação aos genes da toxina CDT, da verotoxina e da intimina, todos os integrantes dos três sorotipos são CDT-V, VT2 e *eae*-negativos.

Tabela 8: Cepas, fontes e origens dos sorotipos estudados.

Sorotipo	Cepas	Fonte	Origem
O91:H21	B10	Bovino	Espanha
	FV965b	Carne	Argentina
	FV3587	Bovino	Argentina
	FV3592	Bovino	Argentina
	FV4144	Água	Espanha
	VTB081	Bovino	Espanha
	VTB131	Bovino	Espanha
	VTB201	Bovino	Espanha
O113:H21	21288b	Humano	Espanha
	21485a	Humano	Espanha
	FV915	Bovino	Argentina
	FV4140	Água	Espanha
	VTB300	Bovino	Espanha
	VTB415	Bovino	Espanha
	VTF025	Carne	Espanha
O116:H21	FV907	Bovino	Argentina
	FV969	Carne	Argentina
	VTB186	Bovino	Espanha
	VTB187	Bovino	Espanha
	VTB188	Bovino	Espanha
	VTB227	Bovino	Espanha
	VTB255	Bovino	Espanha
	VTB282	Bovino	Espanha
	VTB393	Bovino	Espanha
VTB396	Bovino	Espanha	

4.5.1. ANÁLISE DAS CEPAS DE O91:H21, O113:H21, O116:H21 POR PFGE

Os três conjuntos de amostras de igual sorotipo foram submetidos ao protocolo descrito no item 4.2 (página 42) para a realização dos géis de eletroforese de campo pulsado.

No experimento realizado com as cepas O91:H21 (Figura 17) observa-se que as duas cepas que foram consideradas clones (VTB131 e VTB 201) foram agrupadas em um ramo com outras cepas de bovinos da Espanha. Duas cepas isoladas de bovinos na Argentina foram agrupadas com aproximadamente 95% de

similaridade. As cepas isoladas de carne e água apresentaram diferenças que foram detectadas pelo software, que as classificou como pouco similares.

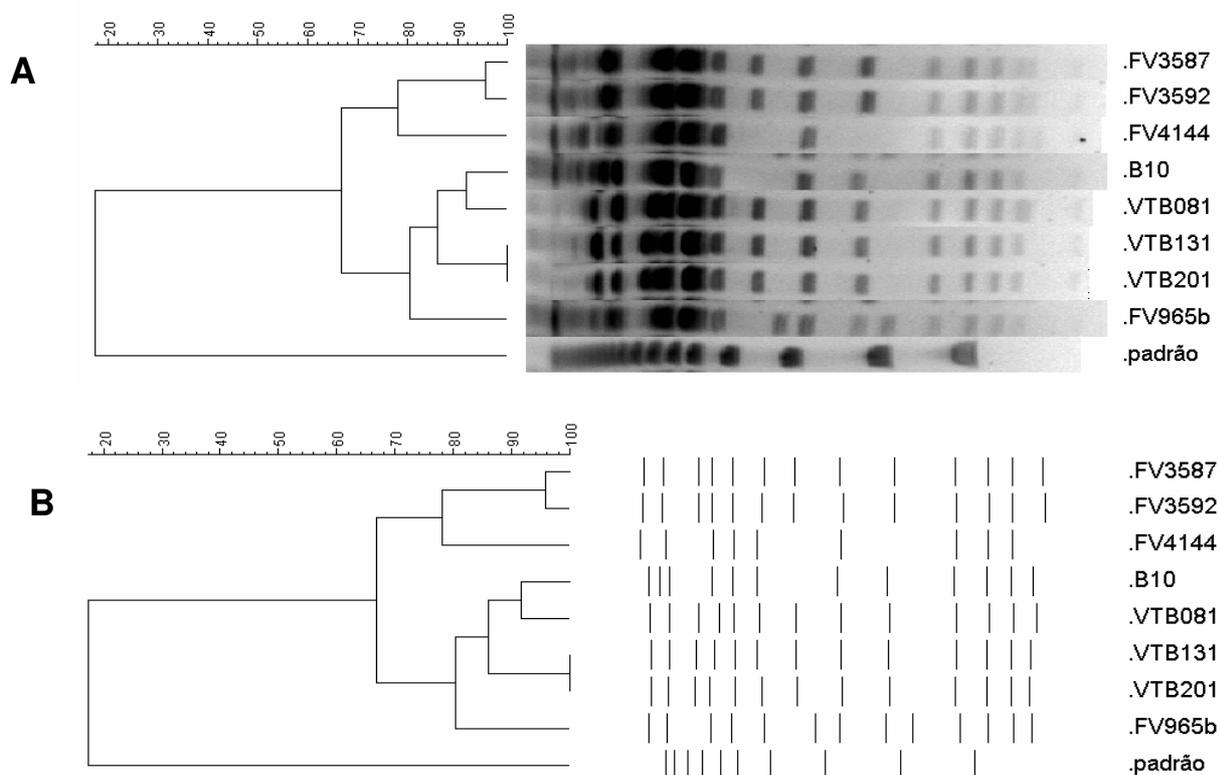


Figura 17: Dendrograma das cepas pertencentes ao sorotipo O91:H21. As relações entre cepas apresentadas em A e B são idênticas. A, padrão de migração eletroforética de cada cepa e B, bandas selecionadas pelo software Gel Compar II e que foram utilizadas para a construção do dendrograma.

No dendrograma da Figura 18 observa-se que não há clones entre as amostras O113:H21 e que há formação de cinco diferentes grupos de cepas localizados em dois ramos distintos. Tanto o primeiro quanto o segundo ramo agruparam cepas de fontes diferentes, porém somente no primeiro ramo ocorreu o agrupamento de cepas de mesma origem (Espanha). Os índices de similaridade

mais altos ficaram próximos de 70% em ambos os ramos. Vale destacar que as cepas humanas (21288b e 21485a) foram classificadas em ramos distintos.

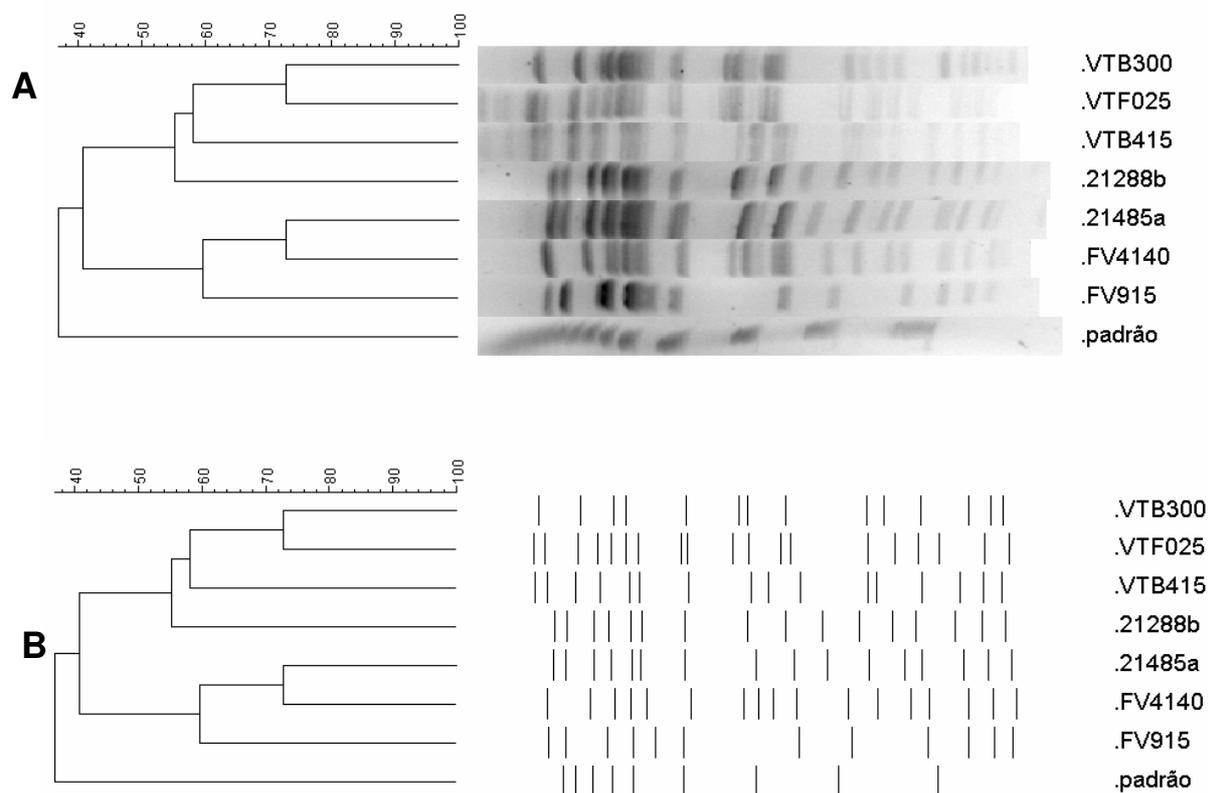


Figura 18: Dendrograma das cepas pertencentes ao sorotipo O113:H21. As relações entre cepas apresentadas em A e B são idênticas. A, padrão de migração eletroforética de cada cepa e B, bandas selecionadas pelo software Gel Compar II e que foram utilizadas para a construção do dendrograma.

No dendrograma obtido das cepas O116:H21 (Figura 19) observa-se que não há clones entre as amostras e que há formação de seis diferentes grupos de cepas reunidos em dois ramos; o primeiro ramo reúne oito cepas e o segundo, duas cepas. O primeiro ramo agrupou praticamente só cepas bovinas provenientes da Espanha, à exceção de VF969, que foi isolada de carne, e de FV907 que é proveniente da

Argentina, sendo que os maior índice de similaridade neste ramo ocorreu entre as cepas VTB 188 e VTB255 e foi de mais de 80%. A similaridade mais alta deste dendrograma ocorreu no segundo ramo, que agrupou cepas de mesma fonte e origem, e foi de mais de 85%.

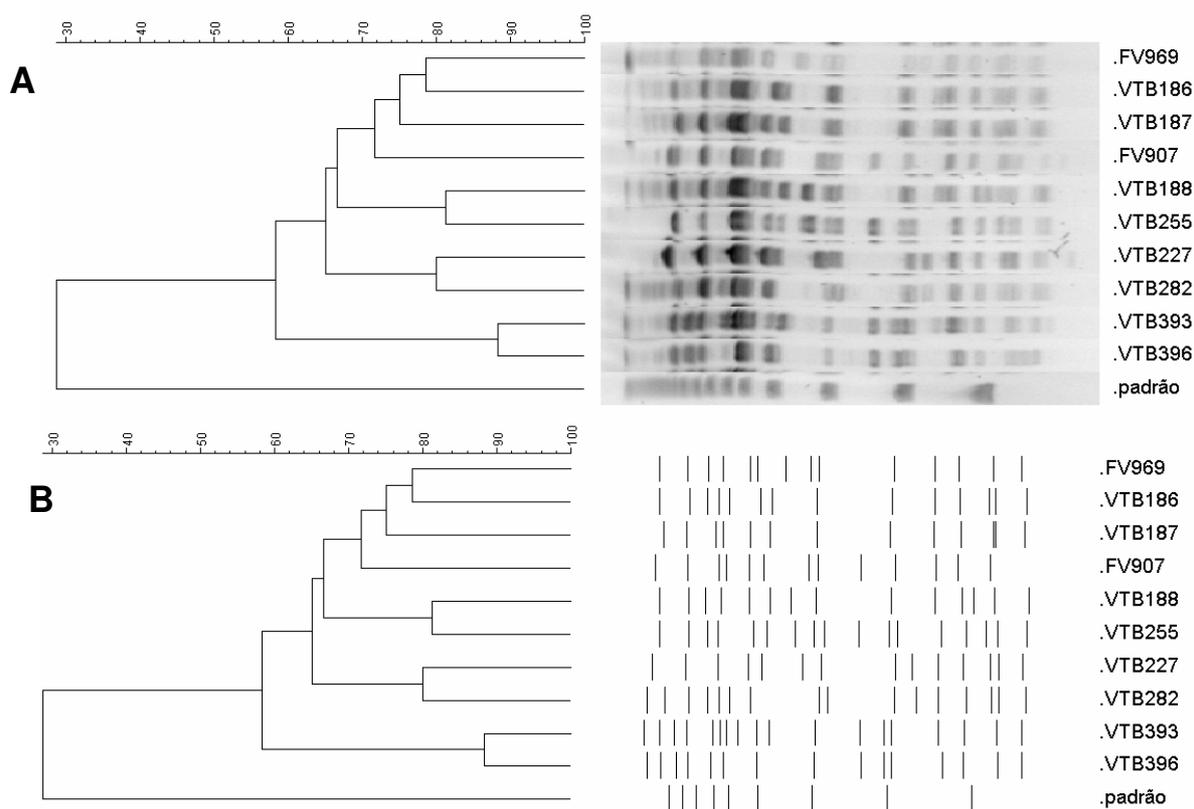


Figura 19: Dendrograma das cepas pertencentes ao sorotipo O116:H21. As relações entre cepas apresentadas em A e B são idênticas. A, padrão de migração eletroforética de cada cepa e B, bandas selecionadas pelo software Gel Compar II e que foram utilizadas para a construção do dendrograma.

DISCUSSÃO

Com a descoberta, em 1987, de uma citotoxina em *Escherichia coli* de ação diferentes das toxinas até então conhecidas, uma nova família de toxinas foi proposta: a das toxinas citoletais distensoras. Responsável pela interrupção, em células eucarióticas, do ciclo mitótico devido a danos na dupla fita do DNA, esta toxina tem levantado grandes debates entre os pesquisadores sobre a sua função na patogênese das bactérias que carregam seus genes. Isso porque sua atuação em culturas de células eucarióticas é razoavelmente bem conhecida, porém sua atividade *in vivo* ainda não passa de mera especulação. Estas especulações variam desde bloquear a mitose no epitélio das mucosas como meio de facilitar a colonização e invasão dos patógenos até, devido a sua ação direta sobre o ciclo mitótico e alteração das cascatas de transdução de sinal, causar câncer em indivíduos que tenham sido infectados.

As cepas estudadas neste trabalho foram selecionadas na bacterioteca do Laboratório de Referência de *Escherichia coli* (LREC), da Faculdade de Veterinária da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

Pesquisando a presença dos genes de CDT na coleção de *E. coli* verotoxigênicas (VTEC) e nas cepas isoladas pela COLIREN-O157 (página 25), Leite D.S. (comunicação pessoal) obteve dados que revelaram que das 1.693 cepas de VTEC estudadas, 80 (4,7%) foram positivas para CDT. Dentre estas, 79 (98,7%) apresentaram o alelo III e apenas uma o alelo IV. No estudo realizado com cepas isoladas de humanos pela COLIREN-O157 foi observado que dentre as 200 cepas analisadas, 30 (15,0%) foram positivas para *cdt*. Os genes do alelo I foram

encontrados em 11 cepas (36,7%), o alelo III foi detectado em nove cepas (30,0%), o alelo IV em oito cepas (26,7%) e o alelo II, detectado em apenas duas cepas (6,7%). Foi observada ainda a forte associação de CDT com o gene *eae*, visto que 26 cepas (86,7%) apresentaram ambos os genes.

Assim, utilizando 60 cepas CDT-positivas da coleção de VTEC e 20 cepas da coleção COLIRED-O157, este trabalho teve por objetivo a realização de ensaios para a identificação dos alelos de CDT, incluindo a pesquisa do alelo V entre as cepas positivas para o alelo III e estudar suas associações com os fatores de virulência associados a EHEC e VTEC.

Os ensaios para determinação dos alelos I, II e IV de CDT confirmaram os resultados obtidos anteriormente, entretanto após a pesquisa do alelo V, dentre as cepas CDT-III, a distribuição de CDT-III e CDT-V entre as cepas foi de 37,5% e 46,3%, respectivamente. Os estudos anteriores à descrição do alelo V indicavam que o alelo III era mais freqüente em cepas isoladas de animais, principalmente de bovinos (Clark *et al.*, 2002; Mainil *et al.*, 2003).

Em dois trabalhos recentes, Bielaszewska e colaboradores (2004) encontraram 5,0% de amostras CDT-positivas, sendo que elas se distribuíam somente entre CDT-III e CDT-V, com 82,0% de cepas CDT-V; e Friedrich e colaboradores (2006) encontraram 4,7% de amostras CDT-positivas, sendo todas as amostras CDT-V. No presente trabalho, o percentual de CDT-V foi de 46,3%, porém, ao contrário dos dois trabalhos citados anteriormente, foram encontrados todos os alelos de CDT dentre as cepas estudadas.

Analisando separadamente os resultados obtidos para as cepas isoladas pela COLIRED-O157 daqueles obtidos com as cepas da coleção de VTEC é possível

afirmar que são dois grupos distintos com características próprias e bastante diferentes entre si. No grupo COLIRED-O157 todos os alelos de CDT foram detectados, sendo que o alelo predominante foi CDT-I, ao passo que o grupo VTEC foi composto quase exclusivamente pelos alelos III e V, com prevalência de CDT-V.

Estes resultados condizem com o trabalho de Clark *et al.* (2002), de Mainil *et al.* (2003) e de Bouzari e colegas (2005); o primeiro relata que em amostras isoladas de humanos há maior incidência do alelo I de CDT e que em amostras animais o alelo mais freqüente é CDT-III. O trabalho de Bouzari e colegas (2005), realizado em amostras isoladas de crianças no Irã, encontrou maior porcentagem de amostras positivas para o alelo I de CDT (55,9%). E o estudo realizado por Mainil e colaboradores (2003) encontrou maior freqüência de amostras CDT-III em isolados provenientes de animais.

Nas cepas VTEC houve predominância dos alelos III e V e baixa freqüência de cepas *eae*-positivas, sendo estes resultados condizentes com o trabalho realizado por Bielaszewska e colegas (2004), que trabalhando somente com cepas VTEC, encontrou apenas os alelo III e V de CDT em cepas *eae*-negativas. Orth e colaboradores (2006), ao estudarem cepas VTEC não-O157, encontraram nas cepas *cdt*-positivas apenas os alelos CDT-III e CDT-V, estando os resultados obtidos no presente trabalho em acordo com os resultados dos autores citados acima.

Os dados obtidos neste trabalho para as amostras VT1 corroboram também os dados de Clark e colaboradores (2002), que observaram associação entre as presenças de CDT-III, VT1 e *cnf2* dentre as amostras. Como é relatado neste mesmo trabalho, a associação entre CDT-III e *cnf2* era esperada em razão de ambos os genes serem localizados no plasmídio pVir, porém a razão da associação destes

genes com VT1 ainda é desconhecida. Neste mesmo grupo de cepas vê-se que a maior parte delas pertence aos grupos filogenéticos B2 e D (patogênicos), possivelmente em decorrência da presença do plasmídeo pVir.

No caso das cepas COLIRED-O157 observa-se que 16 são portadoras do gene da intimina formando, então, um grupo composto em sua grande maioria por cepas de EPEC típica (uma cepa) e atípicas; neste grupo observa-se também que 12 cepas foram enquadradas nos grupos filogenéticos B2 e D, sugerindo que o gene o *eae* deve estar associado à patogenicidade neste grupo de cepas. Curiosamente, nenhuma destas cepas carregava o alelo CDT-V.

Ao se analisar as VTEC, separando-as em portadoras de VT1, de VT2 e em cepas VT1 e 2, observa-se que as cepas VT1 apresentaram CDT-III em 100% das cepas e foram classificadas nos quatro grupos filogenéticos, com predomínio do grupo D. Nas cepas CDT-III positivas, VT1 esteve presente em 80,0% dos casos, mostrando forte associação entre estes dois alelos ($\chi^2=16,49$; G.L.=1 e $p<0,001$).

As cepas VT2 apresentaram forte associação com CDT-V (26/29) ($\chi^2=9,12$; G.L.=1 e $p<0,01$) e apenas três cepas apresentaram CDT-III. Quanto à classificação filogenética nas cepas VT2, observamos que 25 cepas CDT-V foram agrupadas em B1 e três em B2, sendo duas com o alelo III e uma com o alelo V de CDT. Entre as 11 cepas VT1 e 2, observamos os alelos V (8 cepas), III (2 cepas) e I (1 cepa), sendo que nove foram classificadas como B1 e duas como D.

A causa de todas estas associações entre os fatores de virulência e CDT-V ainda merece ser muito estudada a fim de se saber o real papel de CDT nas doenças

e do efeito que todas estas interações de fatores de virulência podem provocar *in vivo*.

Um outro campo em ascensão é o da filogenia ECOR, proposta por Selander e colaboradores em 1987. Clermont e colaboradores (2000) propuseram um método rápido de enquadramento nos quatro grupos filogenéticos baseado na amplificação por PCR de três seqüências. O uso de PCR simples ou multiplex não altera a amplificação dos genes e fragmentos de DNA utilizados nesta classificação, sendo que na presente pesquisa optou-se por amplificar isoladamente cada seqüência e, apesar disso, a metodologia não foi afetada e o enquadramento das cepas estudadas nos grupos filogenéticos foi feito normalmente.

Desde o estudo de Boyd e Hartl (1998), as bactérias dos grupos B2 e D passaram a ser denominadas de patogênicas, da mesma forma, as de A e B1, por possuírem poucos fatores de virulência, passaram a ser consideradas patógenos oportunistas. Porém, sabe-se atualmente que as cepas diarreiogênicas em geral são agrupadas em A e B1 e que, mais especificamente, VTEC e EHEC são agrupadas prioritariamente em A, B1 e D (Escobar-Páramo *et al.*, 2004a).

As cepas isoladas de humanos diarreicos, que compõem o grupo obtido pela COLIRED-O157 (Tabela 1), são enquadradas em sua maioria (65%) nos grupos filogenéticos B1 e B2, estando de acordo com Escobar-Páramo e colegas (2004a), que afirmam ainda que há maior concentração das EPEC nos grupos B1 e B2.

Os dados obtidos do agrupamento filogenético das cepas VTEC, que dizem que 68,3% das VTEC são do grupo B1, estão em acordo com o trabalho de Girardeau e colaboradores (2005), que estudando 287 cepas VTEC, obtiveram 70% de cepas B1.

Os dados aqui obtidos somente se desviam dos de Girardeau e colegas (2005) no tocante às cepas B2, pois no grupo de amostras por eles estudados foram identificadas apenas duas cepas do grupo B2 dentre as 287 estudadas, enquanto neste trabalho foram encontradas 8 cepas no total de cepas verotoxigênicas (66 cepas).

Observamos, ainda, que as cepas do grupo A foram na sua maioria isoladas de humanos, que as cepas B1 foram isoladas principalmente de bovinos, que as B2 foram obtidas em sua maior parte de humanos e as D foram isoladas principalmente de bovinos, sendo que todos estes resultados estão em concordância com os obtidos por Selander e colaboradores (1987) quando do estabelecimento dos grupos da filogenia ECOR.

Nossos resultados concordam com Orth *et al.* (2006), uma vez que não há associação do gene *eae* com algum alelo de CDT em particular, quer seja nas amostras isoladas pela COLIRED-O157, quer seja nas cepas VTEC.

Em se tratando das cepas pertencentes aos sorotipos O91:H21, O113:H21, O116:H21, todas apresentaram resultados bastante uniformes em relação aos fatores de virulência estudados. Todas as cepas são CDT-V, nenhuma delas apresenta o gene *eae* e todas são VT2, coincidindo com os resultados obtidos por Blanco e colaboradores (2004) e todas as cepas pertencem ao grupo B1, à exceção de B10 que pertence ao grupo B2.

Inicialmente cogitava-se que todas as cepas, dentro de seus respectivos sorotipos, fossem clones umas das outras devido à uniformidade genética apresentada por estas cepas. Por apresentarem as características interessantes já descritas e por serem, segundo Blanco e colaboradores (2004), importantes cepas

responsáveis por casos de HUS (no caso de O91:H21 e O113:H21) os três grupos de cepas foram estudados pela técnica de eletroforese de campo pulsado.

Analisando a imagem do gel de PFGE das cepas O91:H21 (Figura 17, página 68) observa-se que houve a formação dois ramos de cepas do sorotipo, com duas cepas sendo clones (VTB 131 e VTB201), possivelmente isoladas durante um surto de diarreia na Espanha. A outra dupla de cepas mais proximamente relacionadas foram FV3587 e FV3592, que também devem ter sido isoladas durante um surto na Argentina e que foram agrupadas com aproximadamente 95% de similaridade. Os outros grupos de cepas formados apresentaram no máximo 80% de similaridade entre si.

Analisando a imagem do gel obtido com as cepas do sorotipo O113:H21 (Figura 18, página 69) observa-se também a formação de cinco grupos de cepas, não havendo a presença de clones nos grupos. A maior porcentagem de similaridade observada neste sorotipo (pouco mais de 70%) ocorreu entre as cepas VTB300 (bovino) e VTF025 (carne), ambas isoladas na Espanha.

Por último, na imagem obtida do gel de PFGE das cepas do sorotipo O116:H21 (Figura 19, página 70) é possível observar a formação de dois grupos de cepas, novamente não havendo clones dentre elas. A maior similaridade de grupo, aproximadamente 80%, ocorreu entre as cepas VTB393 e 396, ambas isoladas de bovinos na Espanha.

A análise geral dos resultados dos géis de PFGE indica que, apesar da aparente uniformidade genética observada no início dos estudos, é possível observar que há uma diversidade genética entre as cepas de mesmo sorotipo e que existem pelo menos duas explicações para este fato. A primeira explicação é a variabilidade

genética natural existe dentro de uma mesma população de seres vivos, que pode fazer com que existam desde indivíduos muito parecidos geneticamente até indivíduos muito diferentes e não relacionados entre si. A segunda explicação para a variabilidade encontrada, presente em Tenover *et al.* (1995), é a repetição do cultivo bacteriano por um longo tempo (mais de seis meses). O trabalho de Iguchi e colaboradores (2002) obteve dados semelhantes após comparar por PFGE amostras de O157:H7 que foram mantidas em estoque e que foram semeadas em meio de cultura duas vezes por semana durante 25 semanas. Possivelmente os resultados encontrados no presente trabalho sejam uma união das duas hipóteses, uma vez que as amostras foram coletadas em 2004 e desde então estão sendo mantidas em estoque e estes refeitos a cada um ano e meio, não sendo possível também excluir a variabilidade inicial das cepas.

Um trabalho de 2007 realizado por Walk e colaboradores exemplifica a variabilidade existente nas populações de *E. coli* isoladas em seis diferentes praias nos E.U.A, chegando ao resultado de que havia uma grande diversidade entre os 40 alelos estudados nas quase 200 amostras isoladas, sendo possível identificar recombinações e possíveis perdas e aquisições de genes. Apesar de estes dados terem sido obtidos de amostras coletadas em ambiente externo aos hospedeiros usuais (habitat secundário), ainda sim é possível aplicar estes dados a cepas isoladas de animais e humanos, uma vez que o habitat secundário é considerado transitório, ou seja, as cepas de *E. coli* coletadas no ambiente foram excretadas por animais e provavelmente em algum momento serão novamente reingeridas (Walk *et al.*, 2007).

Por fim, é possível dizer que este primeiro trabalho sobre análise filogenética

de cepas de *Escherichia coli* CDT-positivas contribuiu com dados a respeito da prevalência do alelo CDT-V neste grupo de cepas estudadas.

Muitos dos dados obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura científica; entretanto, ainda serão necessários novos estudos para responder às questões existentes quanto ao envolvimento de CDT na etiologia das diferentes doenças causadas pela *E. coli*.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- O alelo V de CDT foi o mais freqüente dentre as 80 cepas estudadas;
- O alelo VT2 mostrou forte associação com CDT-V;
- O alelo CDT-III mostrou-se associado a VT1 em 79,0% das cepas
- O grupo filogenético B1 foi o mais prevalente entre as cepas estudadas a despeito de suas origens (56,3%), e o A foi o de menor representatividade nas cepas em geral;
 - Nas cepas isoladas pela COLIRED-O157 houve a prevalência de CDT-I e do grupo filogenético B2;
 - Nas cepas VTEC ocorreu maior freqüência de CDT-V e do grupo B1;
 - A técnica de PFGE permitiu identificar, dentro dos grupos formados por cepas pertencentes aos sorotipos O91:H21, O113:H21 e O116:H21, a existência de clones, de cepas que guardam relação entre si e de cepas que não tem relação entre si, mostrando a existência de uma diversidade entre as cepas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, J.A.; JIANG, Z.D.; MATHEWSON, J.J.; VERENKAR, M.P.; THOMPSON, S.; MARTINEZ-SANDOVAL, F.; STEFFEN, R.; ERICSSON, C.D.; DUPONT, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 12, p. 1706-1709, 2001.

ARAGON, V.; CHAO, K.; DREYFUS, L.A. Effect of cytolethal distending toxin on f-actin assembly and cell division in chinese hamster ovary cells. **Infect Immun**, v. 65, n. 9, p. 3774–3780, 1997.

AKIFUSA, S.; HEYWOOD, W.; NAIR, S.P.; STENBECK, G.; HENDERSON, B. Mechanism of internalization of the cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Microbiology**, v. 151, p. 1395–1402, 2005.

BEUTIN, L.; KAULFUSS, S.; HEROLD, S.; OSWALD, E.; SCHMIDT, H. Genetic analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O103 strains by molecular typing of virulence and housekeeping genes and pulsed-field gel electrophoresis. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 4, p. 1552-1563, 2005.

BIELASZEWSKA, M.; FELL, M.; GREUNE, L.; PRAGER, R.; FRUTH, A.; TSCHAPE, H.; SCHMIDT, M.A.; KARCH, H. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. **Infect Immun**, v. 72, p. 1812-1816, 2004.

BIELASZEWSKA, M.; SINHA, B.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 1, p. 552–562, 2005,

BIRREN, B.W.; LAY, E.; HOOD, L.; SIMON, M.I. Optimized conditions for pulsed field electrophoretic separations of DNA. **Nucl Acids Res**, v.16, p. 7563-7581, 1988.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; GONZALEZ, E.A.; MORA, A.; JANSEN, W.; GOMES, T.A.; ZERBINI, L.F.; YANO, T.; DE CASTRO, A.F.; BLANCO, J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 11, p. 2958-63, 1997.

BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; DAHBI, G.; COIRA, M.A.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 311–319, 2004.

BLATTNER, F.R.; PLUNKETT, G.I.; BLOCH, C.A.; PERNA, N.T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J.D.; RODE, C.K.; MAYER, G.F.; GREGOR, J.; DAVIS, N.W.; KIRKPATRICK, H.A.; GOEDEN, M.A.; ROSE, D.J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, p. 1453-1461, 1997.

BONACORSI, S.P.P.; CLERMONT, O; TINSLEY, C.; LE GALL, I.; BEAUDOIN, J.C.; ELION, J.; NASSIF, X.; BINGEN, E. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. **Infect Immun**, v. 68, p. 2096-2101, 2000.

BOUZARI, S.; OLOOMI, M.; OSWALD, E. Detection of the cytolethal distending toxin locus *cdtB* among diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from humans in Iran. **Res Microbiol**, v. 156, p. 137-144, 2005.

BOYD, E.F.; HARTL, D.L. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. **J Bacteriol**, v. 180, p. 1159-1165, 1998.

CERGOLE-NOVELLA, M.C.; NISHIMURA, L.S.; SANTOS, L.F.; IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; BERGAMINI, A.M.M.; GUTH, B.E.C. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. **FEMS Microbiol Lett**, v. 274, n. 2, p. 329-334, 2007.

CLARK, C.G.; JOHNSON, S.T.; EASY, R.H.; CAMPBELL, J.L.; RODGERS, F.G. PCR for detection of *cdt-III* and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolates from humans and cattle. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 2671-2674, 2002.

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

CORTES-BRATTI, X.; KARLSSON, C.; LAGERGÅRD, T.; THELESTAM, M.; FRISAN, T. The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the DNA damage checkpoint pathways. **J Biol Chem**, v. 276, n. 7, p. 5296–5302, 2001.

DE RYCKE, J.; OSWALD, E. Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation? **FEMS Microbiol Lett**, v. 203, p. 221–233, 2001.

ESCOBAR-PÁRAMO, P.; GRENET, K.; LE MENAC'H, A.; RODE, L.; SALGADO, E.; AMORIN, C.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; RAHIMY, M.C.; ANDREMONT, A.; DENAMUR, E.; RUIMY, R. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, n. 9, p. 5698–5700, 2004.

ESCOBAR-PÁRAMO, P.; CLERMONT, O.; BLANC-POTARD, A.-B.; BUI, H.; LE BOUGUÉNEC, C.; DENAMUR, E. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. **Mol Biol Evol**, v. 21, n. 6, p. 1085-1094, 2004a.

FINNEY, M. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In: AUSUBEL, F.M; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D; SEIDMAN, J.D.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (Ed.). **Curr protocols mol biol**, New York: Greene-Wiley,1993. v.1, p. 2.5.9-2.5.17.

FOSTER, G.; ROSS, H.M.; PENNYCOTT, T.W.; HOPKINS, G.F.; MACLAREN, I.M. Isolation of *Escherichia coli* O86:K61 producing cytolethal distending toxin from wild birds of the finch family. **Lett App Microbiol**, v. 261, p. 395-398, 1998.

FRIEDRICH, A.W.; LU, S.; BIELASZEWSKA, M.; PRAGER, R.; BRUNS, P.; XU, J.-G.; TSCHÄPE, H.; KARCH, H. Cytolethal distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 5, p. 1844–1846, 2006.

GHILARDI, A.C.; GOMES, T.A.; TRABULSI, L.R. Production of cytolethal distending toxin and other virulence characteristics of *Escherichia coli* strains of serogroup O86. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 703-708, 2001.

GIAMMANCO, G.M.; PIGNATO, S.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D.; CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; GIAMMANCO, G. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated in Italy and in France. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 12, p. 4619–4624, 2002.

GIRARDEAU, J.P.; DALMASSO, A.; BERTIN, Y.; DUCROT, C.; BORD, S.; LIVRELLI, V.; VERNZOY-ROZAND, C.; MARTIN, C. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 12, p. 6098-6107, 2005.

GUTH, B.E.; GIRALDI, R.; GOMES, T.A.T.; MARQUES, L.R.M. Survey of cytotoxin production among *Escherichia coli* strains characterized as enteropathogenic (EPEC) by serotyping and the presence of EPEC adherence factor (EAF) sequences. **Can J Microbiol**, v. 40, p. 341-344, 1994.

HEYWOOD, W.; HENDERSON, B.; NAIR, S.P. Cytolethal distending toxin: creating a gap in the cell cycle. **J Med Microbiol**, v. 54, p. 207–216, 2005.

IGUCHI, A.; OSAWA, R.; KAWANO, J.; SHIMIZU, A.; TERAJIMA, J.; WATANABE, H. Effects of repeated subculturing and prolonged storage at room temperature of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on pulsed-field gel electrophoresis profiles. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 8, p. 3079–3081, 2002.

JANKA, A.; BIELASZEWSKA, M.; DOBRINDT, U.; GREUNE, L.; SCHMIDT, M.A.; KARCH, H. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. **Infect Immun**, v. 71, n. 6, p. 3634-3638, 2003.

KADHUM, H.J.; BALL, H.J.; OSWALD, E.; ROWE, M.T. Characteristics of cytotoxic necrotizing factor and cytolethal distending toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from meat samples in Northern Ireland. **Food Microbiol**, v 23, p. 491-497, 2006.

KAHALI, S.; SARKAR, B.; RAJENDRAN, K.; KHANAM, J.; YAMASAKI, S.; NANDY, R.K.; BHATTACHARYA, S.K.; RAMAMURTHY, T. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 9, p. 4111-4120, 2004.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p.123-40, 2004.

KESKIMAKI, M.; EKLUND, M.; PESONEN, H.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A.; STUDY GROUP. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 40, n. 4, p. 151-156, 2001.

LARA-TEJERO, M.; GALÁN, J.E. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. **Science**, v. 290, p. 354-357, 2000.

LARA-TEJERO, M.; GALÁN, J. E. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. **Infect Immun**, v. 69, p. 4358-4365, 2001.

LAX, A.J. Bacterial toxins and cancer - a case to answer. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, p. 343-349, 2005.

LECOINTRE, G.; RACHDI, L.; DARLU, P.; DENAMUR, E. *Escherichia coli* molecular phylogeny using incongruence length difference test. **Mol Biol Evol**, v. 15, p. 168-1695, 1998.

LEE, R.B.; HASSANE, D.C.; COTTLE, D.L.; PICKETT, C.L. Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. **Infect Immun**, v. 71, p. 4883-4890, 2003.

MAINIL, J.G.; JACQUEMIN, E.; OSWALD, E. Prevalence and identity of *cdt*-related sequences in necrotoxigenic *Escherichia coli*. **Vet Microbiol**, v. 94, p. 159-165, 2003.

MARQUES, L.R.; TAVECHIO, A.T.; ABE, C.M.; GOMES, T.A. Search for cytolethal distending toxin production among fecal *Escherichia coli* isolates from Brazilian children with diarrhea and without diarrhea. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 2206-2208, 2003.

MASLOW, J.N.; SLUTSKY, A.M.; ARBEIT, R.D. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: PERSING, D.H.; SMITH, F.; TENOVER, F.C; WHITE, T.J. (Ed.). **Diagnostic molecular microbiology**: principles and application. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1993. p. 563-572.

MEACHAM, K.J.; ZHANG, L.; FOXMAN, B.; BAUER, R.J.; MARRS, C.F. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 11, p. 5224–5226, 2003.

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

NEŠIĆ, D.; HSU, Y.; STEBBINS, C.E. Assembly and function of a bacterial genotoxin. **Nature**, v. 429, p. 429-433, 2004.

OCHMAN, H.; SELANDER, R.K. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. **J Bacteriol**, v. 157, p. 690-692, 1984.

ORTH, D.; GRIF, K.; DIERICH, M.P.; WÜRZNER, R. Cytolethal distending toxins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: alleles, serotype distribution and biological effects. **J Med Microbiol**, v. 55, p. 1487-1492, 2006.

PÉRÈS, S.Y.; MARCHES, O.; DAIGLE, F.; NOUGAYREDE, J.P.; HERAULT, F.; TASCA, C.; DE RYCKE, J.; OSWALD, E. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. **Mol Microbiol**, v. 24, p. 1095-1107, 1997.

PICARD, B.; GARCIA, J.S.; GOURIOU, S.; DURIEZ, P.; BRAHIMI, N.; BINGEN, E.; ELION, J.; DENAMUR, E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect Immun**, v. 67, p. 546-553, 1999.

PICKETT, C.L.; COTTLE, D.L.; PESCI, E.C.; BIKAH, G. Cloning, sequencing and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. **Infect Immun**, v. 62, p. 1046-1051, 1994.

PICKETT, C.L.; WHITEHOUSE, C.A. The cytolethal distending toxin family. **Trends Microbiol**, v. 7, p. 292–297, 1999.

ROSARIO, C.C.; LÓPEZ, C.C.; TÉLLEZ, I.G.; NAVARRO, O.A.; ANDERSON, R.C.; ESLAVA, C.C. Serotyping and virulence genes detection in *Escherichia coli* isolated from fertile and infertile eggs, dead-in-shell embryos, and chickens with yolk sac infection. **Avian Dis**, v. 48, p. 791–802, 2004.

SAARI, M.; CHEASTY, T.; LEINO, K.; SIITONEN, A. Phage types and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in Finland. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 3, p. 1140–1143, 2001.

SANNES, M.R.; KUSKOWSKI, M.A.; OWENS, K.; GAJEWSKI, A.; JOHNSON, J.R. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* Isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. **J Infect Dis**, v. 190, p. 2121–2128, 2004.

SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed gradient electrophoresis. **Cell**, v. 37, p. 67-75, 1984.

SCOTT, D.A.; KAPER, J.B. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. **Infect Immun**, v. 62, p. 244-251, 1994.

SELANDER, R.K.; CAUGANT, D.A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J.M.; GILMOUR, M.N.; WHITTAM, T.S. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*, In: NEIDHARDT, F.C.; INGRAHAM, J.L.; LOW, K.B.; MAGASSANIK, B.; SCHACCHTER M.; UMBARGER, H.E. (Ed.) ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium***: cellular and molecular biology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987. p. 1625-1648.

SILVA, A.S.; LEITE, D.S. Investigation of putative CDT gene in *Escherichia coli* isolates from pigs with diarrhea. **Vet Microbiol**, v. 89, p. 195-199, 2002.

SONNTAG, A.K.; BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; DIERKSEN, N.; SCHIERACK, P.; WIELER, L.H.; SCHMIDT, M.A.; KARCH, H. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 12, p. 8855-8863, 2005.

TAN, K.S.; ONG, G.; SONG, K.P. Introns in the cytolethal distending toxin gene of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J Bacteriol**, v. 187, n. 2, p. 567–575, 2005.

TAYLOR, N.S.; GE, Z.; SHEN, Z.; DEWHIRST, F.E.; FOX, J.G. Cytolethal distending toxin: a potential virulence factor for *Helicobacter cinaedi*. **J Infect Dis**, v. 188, n. 12, p.1892-1897, 2003.

THELESTAM, M.; FRISAN, T. Cytolethal distending toxins. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 152, p. 111–133, 2004.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

TÓTH, I.; OSWALD, E.; MAINIL, J.G.; AWAD-MASALMEH, M.; NAGY, B. Characterization of intestinal *cnf1+* *Escherichia coli* from weaned pigs. **Int J Med Microbiol**, v. 290, p. 539-542, 2000.

TÓTH, I., HERAULT, F.; BEUTIN, L.; OSWALD, E. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 4285-4291, 2003.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. (Ed.) **Microbiologia**. Editora Atheneu, 3^a edição, 1999.

UENO, Y.; OHARA, M.; KAWAMOTO, T.; FUJIWARA, T.; KOMATSUZAWA, H.; OSWALD, E.; SUGAI, M. Biogenesis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin holotoxin **Infect Immun**, v. 74, n. 6, p. 3480–3487, 2006.

WALK, S.T.; ALM, E.W.; CALHOUN, L.M.; MLADONICKY, J.M.; WHITTAM, T.S. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. **Environ Microbiol**, v. 9, n. 9, p. 2274-2288, 2007.

YAMADA, T.; KOMOTO, J.; SAIKI, K.; KONISHI, K.; TAKUSAGAWA, F. Variation of loop sequence alters stability of cytolethal distending toxin (CDT): Crystal structure of CDT from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Protein Sci**, v. 15, p. 362-372, 2006.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; SATO, H.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K-I; ENOMOTO, K. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 1, p. 294-297, 2002.