

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/39461
IB/81452

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

Ai21

d



Universidade Estadual de Campinas

Leila Aidar

**Deteccção do gene *eae* e tipos de intimina em amostras de
Escherichia coli isoladas de bovinos com diarréia**

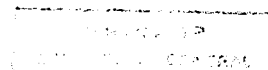
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Leila Aidar
e aprovada pela Comissão Julgadora.
30/09/99

**Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção de Título
de Mestre em Genética e Biologia
Molecular na área de Microbio-
logia.**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

Co-Orientador: Prof. Dr. Jorge Blanco Alvarez

1999



UNICAMP	IB
T/UNICAMP	
Aidai	
3946I	
229/99	
	☒
R\$ 11,00	
18/11/99	

CM-00136895-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP

Aidar, Leila

Ai21d Detecção do gene *eae* e tipos de intimina em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bovinos com diarreia/Leila Aidar.

Campinas, SP: [s.n.], 1999.

124f: illus.

Orientador: Antonio Fernando Pestana de Castro

Co-Orientador: Jorge Blanco Alvarez

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. Bezerros. 3. Diarreia. I. Castro, Antonio Fernando Pestana de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto De Biologia. III. Título.

Data da defesa: 30 de Setembro de 1999

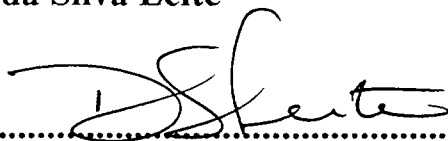
Banca Examinadora

Titulares:

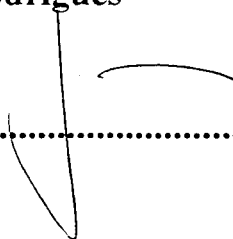
Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro (orientador)



Prof. Dr. Domingos da Silva Leite



Prof. Dr. Josias Rodrigues



Suplente:

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Aos meus pais, pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos de minha vida e ao meu noivo Ricardo, pelo amor, compreensão e incentivo durante o mestrado.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, pela orientação, pelo conhecimento transmitido, pela amizade, carinho, apoio e confiança.

Ao Prof. Dr. Jorge Blanco, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Veterinária da Universidade de Santiago de Compostela – Lugo – Espanha, pela co-orientação e pelos conhecimentos transmitidos.

À Prof. Dra. Marlene Braide Serafim, responsável pelos meus primeiros passos na microbiologia.

Ao Prof. Dr. Fernando De Ávila, do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP, pelo fornecimento das amostras.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, por toda sua ajuda na solução de problemas, além de sua participação no exame de qualificação, banca prévia e definitiva.

À Prof. Dra. Lucila Costallat Ricci, pelo apoio, amizade e carinho.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pelo apoio e pela participação no exame de qualificação e banca prévia.

À Prof. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, pelo apoio na cultura de células e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira e à Prof. Dra. Clarice Weins Arns pelo apoio.

Ao Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade da Universidade Estadual do Rio de Janeiro pelo apoio no teste de FAS e pela minha acolhida em seu laboratório.

À Prof. Dra. Tânia A. T. Gomes do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal Paulista – UNIFESP, pela ajuda na solução de problemas.

Ao Prof. Dr. Josias Rodrigues do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, pela participação na banca prévia e definifiva.

À Adriana, por toda a sua ajuda e amizade e aos amigos Keila, Cristiane, Michelle, Juliana e Gerson, por todo apoio e carinho.

À Mirtis, pela amizade e pelos seus préstimos na solução dos problemas técnicos e administrativos.

À Lourdes pela atenção e ajuda.

À todos os funcionários e amigos do Departamento de Microbiologia.

À CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro.

Ao CNPq pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa (Nível IA) concedida ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro.

Em especial à Fabiana, amiga de todas as horas, que muito me incentivou durante o mestrado.

Sumário

I.	Índice de Abreviaturas.....	IX
II.	Índice de Tabelas.....	X
III.	Índice de Figuras.....	X
IV.	Resumo.....	XII
V.	Abstract.....	XV
VI.	Introdução.....	1
VII.	Objetivos.....	19
VIII.	Material e Métodos.....	20
1.	Amostras Padrão.....	20
1.1.	Amostras Padrão de Aderência.....	20
1.2.	Amostras Padrão de Fatores de Colonização.....	21
1.3.	Amostras Padrão Produtoras de Toxinas.....	21
1.4.	Amostras Padrão de EPEC e Padrão das Intiminas α , β , γ e δ	22
2.	Amostras Estudadas.....	22
3.	Manutenção das Amostras.....	22
4.	Pesquisa de Fatores de Virulência.....	23
4.1.	Toxinas.....	23
4.1.1.	Pesquisa da enterotoxina LT-I.....	23
4.1.1.1.	Imuno Hemólise Radial Modificado.....	23
4.1.1.2.	Imuno Hemólise Radial.....	24

4.1.1.3.	PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para detecção da enterotoxina LT-I.....	24
4.1.2.	Pesquisa da enterotoxina LT-II.....	27
4.1.2.1.	PCR para detecção da enterotoxina LT-II.....	27
4.1.3.	Pesquisa de STa.....	28
4.1.3.1.	Detecção da Toxina STa através do teste do camundongo recém-nascido [Teste de Dean (DEAN et al., 1973], modificado (GATTI et al., 1985).....	28
4.1.3.2.	PCR para detecção da Toxina STa (OLSVIK et al., 1993).....	28
4.1.4.	Pesquisa de STb.....	30
4.1.4.1.	PCR para detecção da toxina STb (OLSVIK et al., 1993).....	30
4.1.5.	Pesquisa de CNF1 e CNF2.....	31
4.1.5.1.	PCR para detecção das toxinas CNF1 e CNF2..	31
4.1.6.	Pesquisa de Stx1 e Stx2.....	33
4.1.6.1.	PCR para detecção das toxinas Stx1 e Stx2 (OLSVIK et al., 1993).....	33
4.2.	Pesquisa do gene <i>eae</i>	36
4.2.1.	PCR.....	36
4.3.	Pesquisa de intimina.....	38
4.3.1.	Western blot para detecção de intimina geral e intimina β	38
4.3.2.	PCR para detecção das intiminas α, β, γ e δ	39
4.4.	PCR para detecção do local de inserção de LEE.....	43
4.5.	Adesinas.....	51
4.5.1.	Aderência às células HeLa e HEp-2.....	51
4.5.1.1.	Preparo das Amostras Bacterianas.....	51
4.5.1.2.	Preparo das células HeLa e HEp-2.....	51
4.5.1.3.	Teste de Adesão.....	52

	4.5.1.4. Teste de Adesão com seis horas de incubação...	53
	4.5.2. PCR para detecção de <i>eaf</i> (FRANKE et al., 1994).....	53
	4.5.3. Microhemaglutinação Manose-Resistente (MHMR).....	55
	4.6. Determinação do Antígeno O	56
	4.7. Determinação do Antígeno H.....	57
	4.8. “Fluorescence Actin Staining Test” (FAS).....	58
IX.	Resultados.....	60
	1. Pesquisa da enterotoxina LT-I.....	60
	2. Pesquisa da enterotoxina LT-II através de PCR.....	60
	3. Pesquisa das toxinas STa, STb, CNF1, CNF2, Stx1 e Stx2.....	61
	4. Teste de Adesão em Células HEp-2.....	61
	5. Teste de Adesão em Células HeLa.....	62
	6. Teste de PCR para detecção do gene <i>eaf</i>	63
	7. Microhemaglutinação Manose-Resistente.....	63
	8. Teste de PCR para detecção do gene <i>eae</i>	63
	9. Western blot para detecção de intimina.....	63
	10. Determinação dos subtipos de intimina (α , β , γ e δ).....	64
	11. Sorogrupagem.....	64
	12. Teste de FAS.....	65
	13. Pesquisa do local de inserção de LEE.....	65
X.	Discussão.....	80
XI.	Conclusões.....	88
XII.	Apêndice.....	90
XIII.	Referências Bibliográficas.....	103
XIV.	Anexos.....	124

I. Índice de Abreviaturas

AA – Aderência Agregativa	PBS – Tampão Salina-Fosfato
AD – Aderência Difusa	PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
ADP – Bifostato de Adenosina	ST – Toxina Termo Estável
A/E – “Attaching and Effacing”	Stx – “Shiga-toxin”
AEEC – “Attaching and Effacing <i>Escherichia coli</i> ”	TIR – “Translocated Intimin Receptor”
AL – Aderência Localizada	
AMPc – Monofosfato de Adenosina cíclico	
BFP – “Bundle forming pilus”	
CAYE – “Casamino Acids Yeast-Extract”	
CNF – Fator Necrotizante Citotóxico	
CL – “Cover Slip”	
CT – Toxina Colérica	
DNA – Ácido Desoxiribonucléico	
EAF – “EPEC Adherence Factor”	
EAggEC – “Enteraggregative <i>Escherichia coli</i> ”	
EHEC – <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica	
ELISA – Ensaio Imuno Enzimático	
EPEC – <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica	
EPM – Escola Paulista de Medicina	
FAS – “Fluorescence Actin Staining”	
GMP – Monofosfato de Guanosina	
GTP – Trifosfato de Guanosina	
Hly – Enterohemolisina	
HUS – Síndrome Urêmica Hemolítica	
Kb – Quilobase	
KDa – Quilodalton	
LEE – “Locus of Enterocyte Effacement”	
LL – Localizada-like	
LT – Toxina Termo Lábil	
MDa – Mega Dalton	
MEM – Meio Essencial Mínimo	
MHMR – Microhemaglutinação Manose-Resistente	
N – Negativa	
NC – Não Característica	
NTEC – <i>Escherichia coli</i> Necrotizante	
OMP – Proteína Externa de Membrana	
ORF – “Open Reading Frame”	

II. Índice de Tabelas

Tabela 1. Resultados dos Testes de Adesão em Células HEp-2 e HeLa.....	66
Tabela 2. Resultados positivos para o gene <i>eae</i> , produção de intimina e sorogrupagem.....	69

III. Índice de Figuras

Figura 1. Resultado do teste de PCR para detecção da enterotoxina LT-II na amostra 280.....	71
Figura 2. Amostra 227 3 horas de incubação em células HeLa–Aderência Agregativa.....	72
Figura 3. Amostra 227 6 horas de incubação em células HEp-2 – Aderência Agregativa.....	72
Figura 4. Amostra 262 3 horas de incubação em células HeLa – Aderência Difusa.....	73
Figura 5. Amostra 262 3 horas de incubação em células HEp-2 – Aderência Difusa.....	73
Figura 6. Amostra 44.4 6 horas de incubação em células HEp-2 – Aderência Localizada-like.....	74
Figura 7. Amostra 309 6 horas de incubação em células HEp-2 – Aderência Difusa.....	74

Figura 8.	Resultado do teste de PCR para detecção do gene <i>eae</i> das amostras 309, 326, 340 e 44.4.....	75
Figura 9.	Resultado do teste de PCR para detecção da intimina β das amostras 326, 340 e 44.4.....	76
Figura 10.	Resultado do teste de Western blot para detecção de intimina das amostras 309, 326, 340 e 44.4.....	77
Figura 11.	Resultado do teste de Western blot para detecção de intimina β das amostras 326, 340 e 44.4.....	78
Figura 12.	Resultado do teste de PCR para determinar o local de inserção de LEE, nas amostras 309, 326, 340 e 44.4.....	79

IV. Resumo

Foram estudadas 52 amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia. Destas, 51 amostras tiveram resultado negativo para as toxinas LT-I, LT-II, STa, STb, Stx1, Stx2, CNF1 e CNF2. Uma amostra apresentou resultado positivo para LT-II. Pelo teste de aderência em células HEP-2 com 3 horas de incubação, obtivemos 31 amostras positivas, das quais 16 (51,61%) apresentaram aderência “Não Característica”, 1 (3,22%) apresentou aderência do tipo “Cover Slip”, 8 (25,80%) apresentaram aderência do tipo “Agregativa”, 5 (16,12%) apresentaram aderência “Difusa” e 1 amostra (3,22%) apresentou aderência do tipo “Localizada-like”. Quando as amostras negativas e “Não Características” foram submetidas a 6 horas de incubação, obtivemos 22 amostras positivas, representando 57,14% de positividade. Destas amostras, 10 (50%) apresentaram aderência “Agregativa”, 5 (25%) apresentaram aderência “Difusa”, 4 (20%) apresentaram aderência “Não Característica” e 1 (5%) amostra apresentou aderência do tipo “Localizada-like”. No teste de aderência a células HeLa com 3 horas de incubação, obtivemos 29 amostras positivas, representando 55,76% do total de amostras testadas. Destas, 5 (17,24%) apresentaram aderência do tipo “Difusa”, 2 (6,90%) apresentaram aderência do tipo “Agregativa”, 1 (3,45%) apresentou aderência do tipo “Cover Slip” e 21 (72,41%) amostras apresentaram

aderência do tipo “Não Característica”. As amostras negativas e as amostras “Não Características” foram testadas com 6 horas de incubação. Destas amostras, 2 (9,09%) apresentaram aderência “Difusa”, 4 (18,18%) apresentaram aderência “Agregativa” e 16 (72,73%) apresentaram aderência “Não Característica”. Diferente do que ocorre em amostras de origem humana, não houve total correlação no padrão de aderência entre as 2 linhagens celulares testadas. O teste de Microhemaglutinação Manose-Resistente não revelou títulos significativos com as hemácias testadas (humana, bovina, equina, de cobaia e de galinha). Dentre as 52 amostras testadas, obtivemos 4 amostras positivas para o gene *eae* em testes de PCR. Destas 4 amostras, 3 apresentaram-se positivas para a intimina β em testes de PCR e Western blot (amostras 326, 340 e 44.4) e 1 amostras (309) não amplificou com nenhum dos iniciadores utilizados para detecção de subtipos de intimina em testes de PCR e também não reagiu com os soros anti-intimina α e β utilizados no teste de Western blot. As amostras 309 e 44.4 tiveram resultado positivo no teste de F A S utilizado na detecção da polimerização da actina celular apresentada nas lesões do tipo “attaching and effacing”, sob os locais onde a bactéria se aderiu. Estas 4 amostras foram testadas em PCR para determinar o local de inserção do LEE. As amostras 309, 326 e 44.4, quando testadas para inserção de LEE em *selC*, amplificaram o gene *selC* intacto, ou seja, sem o LEE inserido neste gene. A amostra 340, neste mesmo teste, apresentou uma banda de maior número de pares de base. Quando estas amostras foram testadas para verificar se ocorria inserção em *pheU*, a amostra 309 amplificou *pheU* intacto, as amostras 326 e 44.4 amplificaram bandas com maior número de pares de base e a amostra 340 apresentou 2 bandas. Essas bandas de tamanhos diferentes podem ser devido a amplificação de *selC*, *pheU* ou até mesmo do LEE,

juntamente com outro gene, ou outra região, o que resultaria em uma amplificação de maior número de pares de base.

V. Abstract

Fifty two strains of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves were studied. The main criteria of choice was the no production of either enterotoxins or cytotoxins. So, fifty one strains were negative to the following toxins: LT-I, LT-II, STa, STb, SLT-I, SLT-II, CNF1 and CNF2. Only one strain was positive for LT-II. By the cell culture assay in HEp-2 cells with 3 hours of incubation, 31 strains were adherent to this cell, and from these 16 (51,61%) strains showed no characteristic (NC) adhesion, 1 (3,22%) strain showed cover slip (CS) adhesion, 8 (25,80) strains showed enteroaggregative (AA) adhesion, 5 (16,12%) strains showed diffuse (DA) adhesion and finally 1 (3,22%) strain showed localized-like (LAL) adhesion. When the negative strains and no characteristic strains were tested by 6 hours of incubation, we had 20 positive strains, with 57,14% of positivity. From these strains, 10 (50%) strains showed aggregative (AA) adhesion, 5 (25%) strains showed diffuse (DA) adhesion, 4 (20%) strains showed no characteristic(NC) adhesion and 1 (5%) strain showed localized-like (LAL) adhesion. In the cell culture assay in HeLa cells with 3 hours of incubation, we had 29 positive strains (55,76% of positivity). Those, 5 (17,24%) strains showed diffuse adhesion(DA), 2 (6,90%) strains showed aggregative (AA) adhesion, 1 (3,45%) strain showed cover slip (CS) adhesion and 21 (72,41%) strains showed non characteristic (NC) adhesion. The negative strains and those showing the non characteristic (NC) strains were tested with 6 hours of

incubation. From these strains, 2 (9,09%) strains showed diffuse (DA) adhesion, 4 (18,18%) strains showed aggregative (AA) adhesion and 16 (72,73%) strains showed non characteristic (NC) adhesion. This uneven data does not occur with human DEC strains where total agreement is observed with results on both cell lines. The MHMR test did not reveal significant titres with the tested erythrocytes (human, bovine, equine, guinea pig and chicken). Among these 52 tested strains, 4 were positive for the *eae* gene as detected by the PCR test. From these 4 strains, 3 showed positive results to β intimin in the PCR and Western blot tests (strains 326, 340 and 44.4) and 1 strain (309) did not amplify with any of the primers used to detect subtype intimins in PCR test and also did not react with anti-intimin α and β antisera used in Western blot test. The strains 309 and 44.4 were positive in the FAS test used for the detection of polymerized cell actin seen in the attaching and effacing lesion, under the local of bacterial adhesion. These 4 strains were tested by PCR to determine the local of LEE insertion into the *Escherichia coli* chromosome. The 309, 326 and 44.4 strains, when tested for LEE insertion on *selC* gene amplified the intact *selC* gene (that is, without LEE inserting into this locus). The 340 strain in this same test showed one band with highest number of bp. When these strains were tested to verify whether the insertion occur in *pheU* locus, the strain 309 amplified the intact *pheU* gene whereas strains 326 and 44.4 amplified bands with highest number of bp and the strain 340 showed two bands. These bands of different sizes could be assumed to be due the *selC* amplification, *pheU* amplification or even simply to LEE, together with other gene, or another region of the chromosome, that resulted on highest amplification of bp numbers.

VI. Introdução

Amostras de *Escherichia coli* podem causar uma grande variedade de doenças. Dentre elas, diarreia, disenteria, síndrome urêmica hemolítica (HUS), infecções nos rins, septicemia, pneumonia e outras, tanto no homem como em animais. Diferentes amostras podem ter genes para um ou mais fatores de virulência, estando associadas com diferentes doenças. A grande maioria das *E. coli* são avirulentas, pois a elas faltam os genes responsáveis pela patogenicidade. Sendo assim, é muito importante que se possa diferenciar os tipos de amostras responsáveis por determinados surtos. Ela está sempre presente no trato intestinal e, usualmente, é um agente que causa infecção secundária, seguindo agentes virais ou outros patógenos intestinais (SALYERS & WHITT, 1994).

A *E. coli* tem sido usada como modelo nos estudos de vários outros microorganismos. Através dela, pudemos entender melhor as vias metabólicas, regulação genética, transdução de sinais, estrutura da parede celular e a transferência de genes através da conjugação bacteriana (SALYERS & WHITT, 1994).

As diarreias são doenças bastante frequentes em bezerros, sendo responsáveis por perdas econômicas significativas. Os agentes causadores de diarreia são vários

e entre eles podemos encontrar a *Escherichia coli*. Muitos sorotipos diferentes tem sido identificados, alguns causando surtos, outros não (CASTRO & YANO, 1992).

A *E. coli* é responsável por duas doenças comuns em bezerros recém nascidos:

a) coli-septicemia, na qual a bactéria invade o sistema circulatório e órgãos internos. A bactéria é capaz de sobreviver e de multiplicar-se no sangue e nos órgãos internos do animal.

b) colibacilose entérica, em que a bactéria localiza-se no lúmen e na superfície mucosa do intestino delgado. Essas não penetram usualmente no corpo pelo sistema linfático ou circulação sistêmica (ACRES, 1985).

A colibacilose é caracterizada clinicamente por diarreia aguda, seguida de desidratação progressiva, acidose metabólica e morte nos casos mais severos. A morte pode ocorrer poucas horas após o desenvolvimento da diarreia. O curso da doença varia de 2 a 4 dias, e a severidade depende da idade do bezerro quando a infecção se inicia e do sorotipo da *E. coli*. Inicia-se durante ou logo após o nascimento, frequentemente por transmissão fecal-oral (CASTRO & YANO, 1992).

Os principais grupos de *E. coli* diarreiogênicos serão descritos a seguir:

***Escherichia coli* Enterotoxigência (ETEC)**

A colibacilose causada por amostras de *E. coli* enterotoxigênicas afeta principalmente animais recém nascidos e pós-desmamados (ACRES, 1985). Ela é responsável por perdas econômicas para criadores de bovinos, ovinos e suínos. Também é considerada na atualidade como a maior causa de diarreia infantil nos países

pouco desenvolvidos, assim como o agente mais frequentemente relacionado com a diarreia dos viajantes (BLANCO, M. et al., 1992).

A patogenicidade das amostras ETEC é devido a dois tipos básicos de fatores de virulência, sendo eles a produção de enterotoxinas e a expressão de adesinas, que permitem à bactéria colonizar o epitélio intestinal do hospedeiro.

Tanto a informação para a produção de enterotoxinas como a expressão dos fatores de colonização residem normalmente em plasmídios que podem codificar conjuntamente ambos os tipos de fatores de virulência.

As amostras ETEC são capazes de produzir dois grupos de enterotoxinas, a ST ou toxina termo-estável e a LT, ou toxina termo-lábil (ALVAREZ, 1991; BEGUM et al., 1993; BETTEY et al., 1986).

A toxina termo-lábil (LT) é uma proteína antigênica, estrutural e funcionalmente semelhante à toxina colérica, sintetizada pelo *Vibrio cholerae*. Existem duas variedades de LT, a LT-I e a LT-II (BLANCO et al, 1991).

Não ocorre a produção de LT-I em amostras de *E. coli* isoladas de diarreia em bezerros, ou pelo menos este fato não foi ainda confirmado. Por outro lado, de acordo com trabalhos publicados no exterior, principalmente na Ásia, a grande maioria das amostras ETEC bovinas parece produzir a enterotoxina LT-II, com grande frequência (BLANCO, comunicação pessoal).

A LT-I é uma proteína com peso molecular de 85.000 a 90.000Da, composta por uma subunidade A, onde reside a atividade enzimática e 5 subunidades B responsáveis pela união da toxina aos receptores epiteliais (Gangliosídios GM1) (HOLMES et al., 1986). A subunidade A transloca-se para o interior da célula epitelial intestinal, atuando sobre a regulação da adenil ciclase, ativando-a através de uma ADP ribosilação. A acumulação resultante de AMPc intracelular interfere no

transporte de sódio e cloro, provocando acúmulo de água e eletrólitos no lúmen intestinal (GILL et al., 1980; HOLMES et al., 1986).

A informação genética para a síntese de LT-I situa-se nos plasmídios transmissíveis (*ToxA* e *ToxB*), que contém a informação da síntese de suas subunidades (BETTEY et al., 1986).

Os genes que codificam para a síntese de LT-II parecem estar localizados no cromossomo bacteriano (BLANCO, M. et al., 1992). A LT-II não se relaciona imunologicamente com LT-I ou CT (Toxina colérica). É produzida em títulos mais baixos. Seu peso molecular é de 87.000 Da. Também ativa a adenil ciclase (HOLMES et al., 1986; PALVA et al. 1981; GUTH et al., 1986).

A toxina LT-II foi primeiramente isolada de animais e raramente é isolada em homens. A subunidade A de LT-II demonstra 55 a 57% de identidade com a subunidade A de LT-I e CT, porém, as subunidades B dessas toxinas não demonstram nenhuma homologia (SEARS & KAPER, 1996).

O outro grupo de toxinas produzidas pela ETEC é a ST, ou toxina termoestável. Essa toxina também possui 2 variedades, a STa e a STb. A STa é solúvel em metanol e causa diarreia (aumento de líquido no intestino) em camundongos lactentes “in vitro”. A STb é insolúvel em metanol, não afetando camundongos lactentes, mas causa acúmulo de fluido em alça intestinal de porcos pós-desmamados (BLANCO et al., 1991). WHIPP, 1990, descreveu que a STb era sensível às proteases e que a utilização de inibidores de tripsina (soja) em ratos e nos testes de alça ligada realizados em camundongos tornavam estes animais susceptíveis a atividade biológica da STb, revelada pelo acúmulo de fluido nas alças. Tanto quanto sabemos, esta enterotoxina não ocorre ou não foi descrita em amostras de colibactérias de bovinos com diarreia.

Assim sendo, amostras ETEC bovinas (principalmente as amostras pertencentes aos sorogrupos O8, O9, O20 e O101) parecem sintetizar somente a enterotoxina STa, que é uma proteína com baixo peso molecular que ativa a guanil-ciclase nas células do epitélio do intestino delgado, o que provoca aumento na concentração de GMP cíclico (BLANCO,J. et al. 1992). Os genes que codificam para a produção de STa encontram-se em plasmídios que também podem conter informação genética para a síntese de LT, fatores de colonização e resistência a antibióticos (BLANCO et al., 1991; BETTEY et al., 1986; DANBARA et al., 1988; THOMPSON, 1987).

Devido ao seu baixo peso molecular, a enterotoxina STa não é imunogênica em condições naturais, a não ser quando acoplada à proteínas. Quando se consegue a produção de anticorpos, nestas condições, podem ser usados testes sorológicos, em especial o teste Ensaio Imuno Enzimático (ELISA). Sua detecção é feita pelo teste do camundongo recém-nascido (DEAN et al., 1973), porém atualmente têm sido utilizados testes de hibridação de DNA ou a Reação em Cadeia da Polimerase.

STa é um peptídeo de 18 ou 19 aminoácidos, rico em cisteína, com massa molecular de 2kDa. É codificada pelo gene *estA* associado a um transposon, que está localizado em plasmídio. Ela age pela sua ligação a um receptor epitelial intestinal protéico na membrana da “brush border”. O número desses receptores no intestino diminui com o aumento da idade do indivíduo (SEARS & KAPER, 1996).

O gene *estB* associado a um plasmídio, codifica uma proteína precursora de 71 aminoácidos, contendo quatro cisteínas que são proteoliticamente processadas no espaço periplasmático, para uma proteína de 48 aminoácidos com 2 ligações dissulfídicas. Esta proteína é secretada extracelularmente. STb induz mudanças histológicas no epitélio intestinal, consistindo na perda da vilosidade celular e atrofia parcial da vilosidade (SEARS & KAPER, 1996).

“Shiga-toxin producing *Escherichia coli*” (STEC)

Embora colibacilos do grupo STEC formem parte da flora normal de gado bovino, em determinadas circunstâncias algumas podem comportar-se como enteropatógenos e provocar diarreia em bezerros (BLANCO, M. et al., 1992; BLANCO et al., 1994; BURNENS et al., 1995; YANO et al., 1986).

Escherichia coli produtora de Shiga-toxins (STEC) tem sido isolada de carne, leite e derivados e de gado com diarreia e muitas vezes de animais sadios, implicando assim na possibilidade desses animais comportarem-se como portadores desses patógenos (DORN et al., 1993; WILLSHAW et al., 1992).

Algumas STEC bovinas tem características similares à *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), de importância em patologia humana produzindo normalmente quantidades elevadas de Shiga-toxins (Stx1 e Stx2), estando associadas com colite hemorrágica, seguida de síndrome urêmica, com letalidade considerável. Estas amostras não são invasivas (DORN et al., 1993; DEAN-NISTRON et al., 1997).

Existem 2 variedades de Shiga-toxins com importância na diarreia de bezerros, Stx1 e Stx2, que são estrutural e biologicamente semelhantes à toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Shiga toxin). Ambas são formadas pelas subunidades A e B. JACKSON et al., 1990, estimaram o peso molecular das subunidades A e B de VT1 em 32.000 e 7.700 Da respectivamente. YUTSUDO et al. purificaram Stx2 e estimaram o peso da subunidade A em 35.000 Da e da subunidade B em 10.700 Da. A subunidade A é capaz de inibir a síntese de proteínas das células, enquanto a subunidade B é responsável pela união da toxina aos receptores celulares Gb3 ou Gb4 (JACKSON et al., 1990; KONOWALCHUK et al., 1977).

Um trabalho de DORN et al. sugere que as *E. coli* produtoras de Stx1 são mais comuns em bezerros e infecções por *E. coli* produtoras de Stx2 são mais comuns em gado mais adulto.

As Shiga-toxins causam paralisia e morte em ratos inoculados por via intravenosa ou intraperitonealmente. Causam atividade enterotóxica moderada em teste de alça ligada de coelho, bem como são capazes de alterar outros órgãos, como o coração e rins. Podem ainda atingir a corrente sanguínea provocando toxemia. Causam danos as paredes endoteliais dos vasos sanguíneos provocando coagulação intravascular e deposição de fibrina no sistema nervoso central (MAC LEOD & GYLES, 1990; O'BRIEN & HOLMES, 1987; BLANCO et al., 1994).

Existe uma terceira variedade de Stx, que é a Stx2v (também constituída por subunidade A, de 35.000 Da e subunidade B, de 75.000 Da), que é sintetizada principalmente por *E. coli* de origem suína dos sorogrupos O138, O139 e O141, não sendo encontrada em amostras de origem humana ou bovina. Estas últimas amostras bem como alguns outros sorogrupos, estão envolvidos numa importante enfermidade em suínos, denominada doença do Edema. Os sinais clínicos são vários, caracterizando-se pela presença de edema e sintomas neurológicos (BLANCO et al., 1994) .

Sabe-se hoje que estas amostras produzem, independente do sorogrupo, uma fimbria, descoberta recentemente, a qual foi denominada F107 . Tudo indica que, até o momento, esta adesina só tem importância em suínos, na doença do edema, sendo improvável a existência em amostras de origem bovina (IMBERECHTS et al., 1994).

Tanto a produção de Stx1 como de Stx2 são controladas por fagos temperados independentes, mas muito relacionados entre si. Os genes para Stx2v estão localizados no cromossomo (MAINIL et al., 1987).

***Escherichia coli* Necrotizante (NTEC)**

Amostras de *E. coli* capazes de produzir CNF (Fator Necrotizante Citotóxico) foram primeiramente reconhecidas em amostras isoladas de diarreia (CAPRIOLI et al., 1983).

Em adição à enterite, amostras de *Escherichia coli* CNF positivas foram demonstradas estarem associadas com infecções extraintestinais no homem, incluindo septicemia e infecções do trato urinário (ALONSO et al., 1987; ALONSO et al., 1992).

Amostras de *Escherichia coli* produzindo CNF também têm sido detectadas em enterite em leitões e bezerros (CAPRIOLI et al., 1983), porém, GONZÁLEZ et al. (1989), descrevem a presença de amostras NTEC em bezerros sem diarreia.

Esta toxina não é excretada para o meio de cultura, sendo necessário o rompimento da bactéria para sua detecção. Ela é capaz de causar necrose em pele de coelho, provocar o aparecimento de células gigantes multinucleadas em várias linhagens celulares, como HeLa, Vero, CHO e HEP-2. O CNF impede a divisão celular, sem interferir na replicação do ácido nucléico, formando células maiores, com vários núcleos de tamanho dez vezes superior ao tamanho normal. A toxina CNF produzida por cepas bovinas é igual à CNF produzida por amostras de origem humana, sendo necrótica em pele de coelho e letal para camundongos injetados intraperitonealmente (BLANCO, J. et al., 1992; BLANCO et al., 1994).

Existem dois tipos de CNF com atividades biológicas similares, porém, sorologicamente relacionadas: CNF1, caracterizando-se por induzir multinucleação acompanhada por arredondamento e aumento do tamanho da célula HeLa e CNF2, onde o grau de multinucleação é menor e as células HeLa sofrem um alongamento

com perda parcial de viabilidade. A produção de CNF1 é típica de NTEC causadora de infecções extraintestinais humanas e a produção de CNF2 é característica de *E. coli* de origem bovina (BLANCO, J. et al., 1992; BLANCO et al., 1994).

Somente CNF2 é capaz de induzir necrose na região plantar da pata de camundongos e produzir um acúmulo de fluido no teste de alça ligada de coelho “in vitro”, mas CNF1 é capaz de provocar edema. CNF1 e CNF2 são proteínas termolábeis de 115 e 110 kDa respectivamente (BLANCO, J. et al., 1992; BLANCO et al., 1994).

Os genes responsáveis pela produção de CNF2 localizam-se em plasmídios transmissíveis de 80 MDa de amostras de *E. coli* isoladas de animais e os responsáveis pela produção de CNF1 encontram-se no cromossomo bacteriano (BLANCO et al., 1992; BLANCO et al., 1994; BLANCO, J. et al., 1992).

Estudos feitos por FALBO et al. (1992) demonstraram a associação de genes codificando a produção de CNF e Hly (hemolisina) no cromossomo de amostras extraintestinais de NTEC .

O mecanismo de ação dessas toxinas é desconhecido, entretanto foi demonstrado que CNF1 altera o arranjo de F-actina e tubulina em células “in vitro”, diminui o número de microvilosidades em células epiteliais não intestinais, e induz células epiteliais a tornarem-se fagocíticas. Essas mudanças no citoesqueleto celular precedem o desenvolvimento da multinucleação e parecem ser responsáveis pela subsequente divisão celular. Embora não esteja claro se os mecanismos de ação das duas toxinas, CNF1 e CNF2 sejam idênticos, dados sugerem que ambas as toxinas modificam covalentemente proteínas Rho, pequenas proteínas ligadas a GTP, relacionadas às Ras que modulam a montagem da actina em células eucarióticas. CNF1 induz polimerização de actina por ativação constitutiva da Rho GTPase e CNF2 modifica

covalentemente Rho por um mecanismo que não envolve ribosilação ou fosforilação de ADP (SEARS & KAPER, 1996).

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

Amostras de EPEC são capazes de induzir profundas alterações em células epiteliais, em modelos animais, culturas de tecido bem como diarreia na espécie humana. Neste último caso, são afetadas crianças com até 1 ano de idade, e mais raramente entre 12 - 24 meses de idade (DYTOC et al., 1993). O termo *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) foi usado primeiramente por NETER et al. em 1955 para descrever isolados de *Escherichia coli* epidemiologicamente ligados à diarreia infantil. A detecção e identificação de amostras EPEC em laboratório clínicos foi e ainda é feita por testes de aglutinação em lâmina, usando anti-soros anti-O, o que pode ser confirmado por testes de aglutinação em tubos para o antígeno O, seguido pela determinação do antígeno H (LAW, 1994).

Uma lesão histopatológica característica é produzida por amostras EPEC quando estes organismos aderem ao tecido intestinal. Esta lesão foi chamada de Attaching and Effacing (A/E) e foi primeiro descrita por STALEY et al. em 1969. Lesões A/E também têm sido observadas em uma variedade de animais-modelo infectados por EPEC. Estas lesões são caracterizadas pela destruição da membrana dos “brush borders” e perda da estrutura das microvilosidades nos sítios de ligação da bactéria (ALBERT et al., 1991; DONNENBERG et al., 1993; AGIN et al., 1996). Os microrganismos aderem intimamente as células, onde se formam proje-

ções tipo pedestal da membrana apical, com 10 nm separando a bactéria da membrana eucariótica (McDANIEL & KAPER, 1997; JERSE & KAPER, 1991; GOFFAUX et al., 1997). Na célula, altas concentrações de filamentos de actina derivados do citoesqueleto estão presentes abaixo do sítio de ligação da bactéria (JERSE et al., 1991). As proteínas do citoesqueleto, tais como actina, α -actinina, talina e ezerina também se acumulam sob as bactérias durante a infecção de células HeLa e HEp-2 (LAW, 1994). Para EPEC, eventos de transdução de sinais específicos têm sido associados com lesões A/E, incluindo fosforilação da tirosina, em uma proteína da célula hospedeira de 90 kDa (Hp90, que é ativada para capacitar a ligação da intimina, outra proteína de membrana codificada pelo gene *eae*, dentro do Locus of Enterocyte Effacement (LEE), fluxos em níveis de inositol fosfato, e fosforilação da cadeia de miosina (ABE et al., 1997; AGIN & WOLF, 1997). O aumento intracelular dos níveis de cálcio descrito como incluído no processo, foi recentemente negado por um dos autores que descreveram o fenômeno (Knutton, comunicação pessoal). Este sinal de transdução de fosforilação da tirosina é dependente sobretudo do gene *sep* que codifica o aparato de secreção tipo III de EPEC e também dos genes *espA* e *espB* (anteriormente conhecido como *eaeB*) que codificam proteínas secretadas via aparato Sep). Ambas as proteínas codificadas por *espA* (EspA) e *espB* (EspB) são requeridas para invasão em células epiteliais in vitro (JARVIS & KAPER, 1996). Até agora, sabe-se que EPEC secreta 5 proteínas, de 110 kDa (EspC), 40 kDa, 39 kDa, 37 kDa (EspB), e 25 kDa (EspA), em meio de cultura, sob certas condições (STEIN et al., 1996). Estas proteínas, exceto EspC, são secretadas pelo sistema de secreção tipo III. Este locus *sep* é homólogo ao sistema similar de secreção tipo III demonstrado em outros patógenos, incluindo espécies de *Yersinia*, *Shigella* e *Salmonella* (ABE et al., 1997). O LEE de EPEC de 35 Kb (McDANIEL et al., 1995), codifica o cluster *sep*, *eaeA*, *espA*, e *eaeB*

(*espB*). Mutações em *sepA*, *sepB*, *espA* e *espB*, todas resultam nos bloqueios em induzir a fosforilação da tirosina de Hp90, proteína atualmente designada de TIR (translocated intimin receptor) em alterar o citoesqueleto da célula hospedeira, e em causar lesões A/E (JARVIS & KAPER, 1996; ABE et al., 1997; STEIN et al., 1996).

Tir, com 78 kDa, é secretada por algumas espécies de EPEC, sendo entregue na célula hospedeira, o que depende do sistema de secreção do tipo III e de outras proteínas secretadas, codificadas pelo LEE. A fosforilação da tirosina de Tir após inserção na membrana da célula epitelial aumenta sua massa aparente para 90kDa, mas isso não é essencial para a ligação da intimina, pelo menos “in vitro”. Isso não parece ocorrer em culturas infectadas por STEC (pelo menos as pertencentes ao sorogrupo O157). A sequência da porção C-terminal da intimina varia entre EPEC, STEC e entre diferentes amostras de STEC. Essa região inclui o domínio provável de ligação da Tir, e é possível que tal heterogenicidade influencie na interação entre a bactéria e o enterócito, assim como pode também ter significado antigênico. A porção C-terminal de Tir também está presumivelmente envolvida em outras funções, como a localização da actina no citoplasma da célula hospedeira imediatamente abaixo da bactéria aderente e a transmissão de sinais adicionais para as células hospedeiras, uma vez que ocorra a interação Tir- intimina (PATON et al., 1998).

Os genes *sep* estão localizados “upstream” (a-montante) em relação ao *eae* e os genes *esp* estão “downstream” (a- jusante) em relação ao *eae* dentro do LEE. Os genes *espA* e *espB* estão separados por aproximadamente 1 Kb (LAI et al., 1997).

A presença de lesões A/E parece estar associada com a secreção do fluido e a diarreia, que são características da infecção por EPEC (JERSE &

KAPER, 1991; LAI et al., 1997; LAW, 1994; McDANIEL & KAPER, 1997; FISCHER et al., 1994; POSPOSCHIL et al., 1987).

O passo inicial de ligação não íntima parece ser mediado pelo “bundle forming pilus” (BFP). Sua importância para virulência de EPEC não está bem estabelecida, mas o BFP é responsável pela aderência localizada de EPEC às células HEp-2. O Locus responsável pela codificação do Bfp encontra-se no plasmídio EAF e a ocorrência de lesões A/E parece não depender da presença de *Bfp* (CANTEY & MOSELEY, 1991; CHINA et al., 1997; DEAN-NYSTRON et al., 1997; GIRÓN et al., 1993; SCALETSKY et al., 1988; SMITH et al., 1990).

KNUTTON et al.(1987), demonstraram que uma amostra EPEC do tipo selvagem, espontaneamente curada do plasmídio EAF, e portanto deficiente na expressão do BFP, foi capaz de aderir a cultura de mucosa intestinal em pequenas microcolônias (embora em número reduzido) e formar as lesões A/E, sugerindo que o plasmídio não é requerido para o estágio posterior da formação de lesões A/E.

A presença do gene *eae* e a presença da proteína de membrana externa (OMP) de 94kDa tem sido associados com a atividade “attaching and effacing” (CANTEY & MOSELEY, 1991; CHINA et al., 1997; DORN et al., 1993; KNUTTON et al., 1997; KNUTTON et al., 1989; MAINIL et al., 1993).

As amostras de *E. coli* com “attaching and effacing” (A/E) mas não-EPEC e por isso chamadas por MOON et.al. (1983) de “AEEC” (attaching and effacing *E. coli*) podem produzir Shiga toxins, causam infecções mistas com outros enteropatógenos, principalmente em animais (bovinos e ovinos). Se administradas oralmente em bezerros privados de colostro desencadeiam diarreia com a presença de sangue (BLANCO et al., 1993; BLANCO et al., 1992; BLANCO et al., 1994; HELIE et al., 1991).

Observações em experimentos usando culturas de linhagens de células epiteliais humanas tem implicado vários genes e seus produtos protéicos na formação de lesões A/E, e um modelo de infecção por EPEC em 3 estágios tem sido sugerido. O primeiro estágio da infecção envolve uma adesão não íntima do bacilo a superfície do enterócito via “bundle-forming pili” (BFP), codificado pelo gene *bfp* no plasmídeo EAF (EPEC adherence factor), de 60 a 70 kDa. O segundo estágio da infecção parece envolver o aparelho de secreção tipo II que medeia a secreção das proteínas de EPEC. Essas proteínas estão implicadas em direcionar sinais a célula hospedeira resultando em rearranjo dos componentes do citoesqueleto, alongamento e vesiculação das microvilosidades (transferência da Tir para a célula que é então fosforilada e inserida na membrana para criar um epítipo de ligação na superfície celular para a intimina). O terceiro estágio da infecção é caracterizado pela íntima ligação mediada pela intimina e acumulação da actina polimerizada em pedestais nos locais onde a bactéria se aderiu, um processo que também parece ser mediado pela Tir e pelo aminoácido C-terminal 280 do polipeptídeo da intimina (Int 280) (GIRÓN et al., 1991; JARVIS & KAPER, 1996; KNUTTON et al., 1997; KNUTTON et al., 1989; JERSE & KAPER, 1991; ADU-BOBIE et al., 1998).

Em trabalho recente, ADU-BOBIE et al.(1998), descreveram a existência de subtipos de intimina designados α , β , γ , δ , cujos genes podem ser identificados através de reação de PCR. A comparação da sequência de aminoácidos das diferentes intiminas tem revelado que as regiões N-terminais são altamente conservadas, enquanto as C- terminais demonstram muito menos similaridade. Todavia, 2 resíduos cys na região C-terminal são conservadas entre todos os membros da família de intiminas. Visto que intimina é altamente imunogênica, é possível que essa diversidade dentro do domínio do polipeptídeo de ligação à célula seja dirigido pela seleção natural. No estudo de ADU- BOBIE et al.(1998), os pesquisadores usaram métodos

imunológicos e genéticos para estudar essa variação antigênica e classificar os domínios de ligação da intimina à célula expressados pelos patógenos que formam lesões A/E. Seus resultados revelaram a presença de pelo menos 5 subtipos de intimina: α , β , γ , δ e uma intimina não tipável expressada por EPEC do sorotipo O127:H40 (ADU-BOBIE et al., 1998).

Durante o último Congresso Internacional de EPEC realizado em São Paulo em 1995 convencionou-se que existem 2 classes de EPEC ou simplesmente EPEC e EPEC Atípica (A-EPEC). A primeira teria EAF, *bfp* e *eae*, enquanto a A-EPEC teria somente *eae* (KAPER, J.B., 1996).

Fatores de colonização

Para que a *Escherichia coli* seja capaz de causar doenças entéricas, ela necessita da capacidade de aderir-se às células epiteliais do intestino. Esse fenômeno é denominado adesão. A estrutura com a qual ocorre a adesão é chamada Fator de Colonização, Fator de Aderência ou Adesina (CASTRO & YANO, 1992).

Essa adesão das bactérias enteropatogênicas evita sua eliminação pelos movimentos peristálticos do intestino e pelo fluxo do conteúdo intestinal (CASTRO & YANO, 1992).

As propriedades adesivas estão associadas com a expressão de apêndices filamentosos de constituição protéica localizados na superfície da bactéria. A informação genética para esses fatores de colonização estão localizados geralmente em plasmídios, mais raramente em cromossomos e quando codificado por plasmídios

e/ou transposons podem conter também genes para síntese de enterotoxinas, em especial STa. A maioria dos fatores de colonização exibem hemaglutinação manose-resistente (MRHA) com tipos específicos de eritrócitos, sendo geralmente expressos por colibacilos cultivados a 37°C mas não a 16°C (BLANCO, M. et al., 1992).

Os fatores de colonização ou adesinas mais conhecidos de amostras de *E. coli* que causam diarreia em bezerros são produzidos pelas ETEC STa positivas e algumas dessas fimbrias que ocorrem em amostras não enterotoxigênicas serão brevemente comentadas à seguir:

K99 - Produzida por ETEC (STa +), de origem protéica, aglutina eritrócitos de cavalo, carneiro e humanos em presença de D-manose. Foi detectado pela primeira vez por ORSKOV et al., 1975, (BLANCO et al., 1993; BLANCO, M. et al., 1992). Essa adesina é um imunógeno bastante eficiente o que torna menos difícil o preparo de vacinas contendo este antígeno (BLANCO et al., 1993; BLANCO et al., 1992; ONO et al., 1989; YOSHIMATSU et al., 1991).

F41 - Amostras ETEC bovinas que também são capazes de expressar o antígeno K99 podem produzir a adesina F41, que confere à bactéria a capacidade de hemaglutinação de eritrócitos de cobaia, humanos e de carneiros na presença de D- manose (BLANCO et al., 1992).

F17 - Anteriormente denominada FY ou Att-25, a F 17 é uma fimbria encontrada em amostras ETEC que também produzem o antígeno K99. É constituída de proteínas (LINTERMANS et al., 1988). Aglutina eritrócitos bovinos na presença de D-manose (BLANCO et al., 1992). A fimbria F17 tem sido encontrada em amostras de *E. coli* enterotoxigênicas e septicêmicas de origem bovina (MAZOUARI et al., 1994). Essa fimbria liga-se eficientemente às vilosidades do epitélio intestinal do bezerro (LINTERMANS et al., 1988).

F165 – Esta fimbria tem sido relatada em amostras de *E. coli* isoladas de leitões e bezerros com septicemia e/ou diarreia (FAIRBROTHER et al., 1986). As *E. coli* F165 + de leitões e bezerros possuem algumas características de bactérias causadoras de doenças extraintestinais, tais como presença do sistema aerobactina (um tipo de sideróforo) e resistência ao efeito bactericida do soro (HAREL et al., 1993). HAREL et al. encontraram o sistema aerobactina em 88% de suas amostras F165 positivas. Essas bactérias proliferam no intestino desses animais apresentando uma variedade de distúrbios entéricos e podem translocar-se extraintestinalmente causando septicemia nesses animais. Estas amostras podem expressar uma ou mais adesinas de diferentes especificidades de receptor, aglutinando eritrócitos de diversas espécies animais. F165 é encontrada somente em um restrito número de sorogrupos e biotipos (HAREL et al., 1993). FAIRBROTHER et al., 1986, demonstraram pela microscopia eletrônica que todas as suas amostras F165 positivas eram altamente fimbriadas quando cultivadas em ágar Minca-IS a uma temperatura de 37 °C, sugerindo a natureza fimbrial do antígeno F165.

CS31A - Codificado por plasmídio, o antígeno fimbrial CS31A pertence ao grupo de adesinas ligadas ao K88 (que ocorre em suínos) sendo expresso por amostras *E. coli* septicêmicas e amostras ETEC. Sua produção parece depender da composição do meio, sendo fraca em meio líquido e inibida pela L-alanina . São organelas fibrilares muito finas (GIRARDEAU et al., 1988).

EAF44 - YANO et al. (1988), descreveram esta fimbria em amostras STEC que possuíam padrões idênticos de MHMR quando as bactérias cresciam em “Colonisation Factor Agar” – CFA. Quando cresciam a 37°C , suspensões dessas amostras apresentavam MHMR somente com eritrócitos humanos do tipo O. Estudo em microscópio eletrônico dessas amostras crescidas em CFA a 37°C por 18 horas revelou estruturas do tipo “fimbria-like”. Após preparado o anti-soro específico para

essa estrutura, que foi provisoriamente chamada EAF44, este anti-soro foi capaz de inibir a MHMR para essas amostras. Culturas dessas bactérias STEC demonstraram aderência difusa em células HeLa.

A14 - Relatada em amostras de colibacilos não-enterotoxigênicos, a fimbria A14 foi isolada de bovinos zebus com sintomatologia diarréica, em amostras altamente fimbriadas. Amostras que possuem esta fimbria são capazes de aglutinar hemácias de carneiro, porco e cavalo (DE AVILA et al., 1988).

VII. Objetivos

1. Verificar a interação entre amostras isoladas de *E. coli* não portadoras dos antígenos K99, F41, F165, F17 e CS31A com células HeLa e HEp-2, verificando se ocorre adesão e de que tipo.
2. Verificar se em amostras de colibacilos isolados de bovinos com diarreia podemos encontrar grupos de *E. coli* que possam apresentar semelhança com, ou serem alocados entre as EPEC, EHEC e até mesmo EAggEC.
3. Estudar nestas amostras a ocorrência de fimbrias, bem como a presença do “attaching - effacing factor” (A/E) e do gene *eae* e respectiva “invasão” como encontrada em EPEC.
4. Determinar o local de inserção do LEE nas amostras onde for detectado o gene *eae*.

VIII. Material e Métodos

1. Amostras Padrão

1.1. Amostras Padrão de Aderência

No desenvolvimento deste trabalho, nos testes de aderência, utilizou-se as seguintes amostras padrão:

<i>E. coli</i> E 2348/69 (EPEC)	Aderência Localizada; eae ⁺ ; A/E, F A S ⁺
<i>E. coli</i> O8 TR 302/4 (DAEC)	Aderência Difusa
<i>E. coli</i> O431-1 (EAggEC)	Aderência Agregativa
<i>E. coli</i> C600 (K12)	Negativa (para todos os testes)

1.2. Amostras Padrão de Fatores de Colonização

As seguintes amostras padrão foram utilizadas neste teste:

K99	<i>E. coli</i> K99+
F165	<i>E. coli</i> PR-4787 O115:H ⁻ :K165+
K88	<i>E. coli</i> K88+
987P	<i>E. coli</i> 603A O9: H ⁻ :K ⁻ 987p+
F41	<i>E. coli</i> B41M
F42	<i>E. coli</i> 567/7 O8: H ⁻
F17	ATT25

1.3. Amostras Padrão Produtoras de Toxina

Todas as amostras padrão utilizadas nos testes para detecção de toxinas foram cedidas pelo Prof. Dr. Jorge Blanco.

P-17	LT-I+, STb+
B62	LT-II+
FVL-2	CNF-1+, AER+, HLY+
FV420	STa+
O157-157	VT1+, VT2+, EAE O157+, Ent Hly+
B66	LT-II+
O157-156	VT1+, VT-2+, EAE O157+, Ent Hly+
P5	VTe+
B4	VTb+
FVL-1	CNF1+

1.4. Amostras Padrão de EPEC e Padrão das Intiminas α , β , γ e δ

E2348/69 (O127:H6)	LA; eae+; A/E; intimina α +
O111:H	Intimina β +
O157:H7	Intimina γ +
O86:H34	Intimina δ +

2. Amostras Estudadas

Na realização deste trabalho foram estudadas 52 amostras de *E. coli*, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Fernando De Avila, do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – “Campus” de Jaboticabal – UNESP – Jaboticabal – SP, as quais foram isoladas de fezes diarréicas de bezerros.

3. Manutenção das Amostras

Durante o desenvolvimento deste trabalho, todas as amostras de *E. coli* foram mantidas em meios de Dorset a 4°C e em meio de TSA (Tryptic Soy Agar – DIFCO).

4. Pesquisa de Fatores de Virulência

4.1. Toxinas

4.1.1. Pesquisa da enterotoxina LT-I

4.1.1.1. Imuno Hemólise Radial Modificado - (YANO et al., 1982)

Cultivou-se as amostras a serem testadas em meio CAYE (Casamino Acids-Yeast Extract) por 18 horas, a 37°C, sob agitação em “Shaker”. Estas foram centrifugadas por 30 minutos a 3000 r.p.m. e somente seus sobrenadantes foram utilizados.

Lavou-se hemácias de carneiro por 3 vezes em tampão trietanolamina diluído 10 vezes e estas foram ressuspensas no mesmo tampão. Fundiu-se a agarose a 1% no tampão trietanolamina e misturou-se a suspensão de hemácias a uma concentração de 5%. Esta agarose foi vertida em tampas de placas de microtítulo e após a sua solidificação foram feitos orifícios com um padrão. Os sobrenadantes a serem testados foram colocados, um para cada orifício, no volume de 20µl. Deixou-se os sobrenadantes-teste difundirem-se na agarose, em câmara úmida à temperatura ambiente, por 18 horas. O soro anti-toxina colérica diluído a 1:30 em tampão trietanolamina foi adicionado em cada orifício, no volume de 20µl. Deixou-se difundir na agarose por 4 horas à temperatura ambiente em câmara úmida. Após este período, a placa foi recoberta com complemento diluído a 1:10 no tampão da reação. Incubou-se por 2 horas a 37°C. O resultado foi obtido medindo-se o halo de hemólise em 2 diâmetros perpendiculares, e comparando-se os tamanhos dos halos das amostras

teste com o halo das amostras controle positivo e controle negativo (que não deve apresentar halo).

4.1.1.2. Imuno Hemólise Radial

As hemácias de carneiro foram lavadas 3 vezes em tampão trietanolamina e, em seguida, foram diluídas a 1:10 no mesmo tampão. Sensibilizou-se as hemácias da seguinte forma: em um tubo 13x100, colocou-se 0,3 ml de hemácias (1:10) e 0,3ml de extrato de cultura em meio CAYE. Incubou-se por 30 minutos a 37°C. Em tubos contendo 1,5ml de agarose a 1%, adicionou-se 0,6ml de hemácias sensibilizadas. Verteu-se essa mistura sobre as lâminas. Deixou-se esfriar e os orifícios foram feitos com um padrão apropriado (SERAFIM et al., 1981). Adicionou-se aos orifícios o soro anti-toxina colérica diluído 1:40 em tampão trietanolamina. Deixou-se por 18 horas à temperatura ambiente em câmara úmida. No dia seguinte, cobriu-se as lâminas com complemento diluído 1:10 em tampão trietanolamina. Deixou-se por 2 horas a 37°C em câmara úmida. O resultado foi obtido através da medição do halo de hemólise que é feito em 2 diâmetros e pela comparação do halo das amostras testes e das amostras controle positivo e negativo.

4.1.1.3. PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para detecção da enterotoxina LT-I

Todas as 52 amostras estudadas foram testadas em nosso laboratório, pelo teste de PCR ou Reação em Cadeia da Polimerase. Este é um método usado para amplificar “in vitro” um número de cópias específicas de uma sequência de DNA de dupla fita. Consiste em repetitivos ciclos compostos de 3 passos térmicos seguindo

desnaturação do DNA alvo em alta temperatura, hibridação de oligonucleotídeos específicos usados como iniciadores por uma DNA polimerase. Durante cada ciclo fitas de DNA complementares à de interesse são copiadas em sua extensão por dois iniciadores, que hibridam com a fita oposta e flanqueiam a região de interesse do DNA alvo. Teoricamente, cada nova molécula de DNA sintetizada é usada como molde no ciclo seguinte, resultando o PCR numa acumulação exponencial de um fragmento específico de uma fita dupla de DNA flanqueado por dois iniciadores.

Pode-se fazer o teste com material genético extraído ou da bactéria inteira. No nosso caso, utilizou-se a bactéria inteira. Duas alçadas da cultura bacteriana (crescida em meio TSA por 18 horas a 37°C) foram coletadas e dissolvidas em 100µl de H₂O Milli-Q estéril. Ferveu-se por 10 minutos para romper a parede e membrana bacterianas e iniciar a desnaturação do DNA. Para evitar o anelamento do DNA já desnaturado, os “eppendorfs” foram colocados imediatamente em banho de gelo após a fervura e foram mantidos assim até o momento do uso. Todos os reagentes utilizados neste teste são da marca Gibco-BRL, com exceção dos iniciadores que foram produzidos pela Pharmacia. Os itens seguintes apresentam os componentes e condições da reação conforme o gene pesquisado.

Para visualização dos resultados, os produtos da amplificação foram aplicados em gel de agarose a 1%, e submetidos a uma diferença de potencial de 100V. Este gel foi então tratado por 20 minutos com Brometo de Etídio. A observação das bandas foi feita em Transiluminador (High Performance Ultraviolet Transilluminator – UVP – Ultra-Violet Products).

Para LT-I foram utilizados os seguintes iniciadores, indicados por PICKETT et al. (1986):

LT-I1 – 5’ – GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC – 3’

LT-I2 – 5’ – CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC – 3’,

que amplificam um fragmento de 696 pb.

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3µl	1,5mM cada
Iniciadores (10µM cada)	1 – 6,5µl 2 – 6,5µl	0,5 µM cada
DNA – Molde	10µl	-
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0,5µl	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	57µl	
TOTAL	100µl	

Para a amplificação foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

- 94°C - 1 minuto (desnaturação)
- 56°C - 1 minutos (anelamento)
- 72°C - 1 minuto (atividade da Taq DNA Polimerase)

4.1.2. Pesquisa de enterotoxina LT-II

4.1.2.1. PCR para detecção da toxina LT-II (PICKETT et.al, 1989)

Utilizou-se a seguinte sequência de iniciadores:

LT II1- 5' - AGA TAT AAT GAT GGA TAT GTA TC – 3'

LT II2- 5' - TAA CCC TCG AAA TAA ATC TC – 3',

que amplificam um fragmento de 300 pb.

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3µl	1,5mM cada
Iniciadores (10µM cada)	1 – 8,5µl 2 – 7,0µl	0,5 µM cada
DNA – Molde	10µl	-
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0,5µl	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	59µl	
TOTAL	100µl	

Para a amplificação foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

94°C - 1 minuto (desnaturação)

52°C - 2 minutos (anelamento)

72°C - 1 minuto (atividade da Taq DNA Polimerase)

4.1.3. Pesquisa de STa

4.1.3.1. Detecção da Toxina STa através do teste do camundongo recém-nascido [Teste de Dean (DEAN et al., 1973)], modificado (GATTI et al., 1985).

Para cada sobrenadante de *E. coli* preparado a partir de cultivo em meio CAYE, como descrito para LT-I, foram utilizados lotes de 3 - 4 camundongos recém nascidos. Colocou-se 2 gotas de azul de Evans para cada 1ml de toxina (sobrenadante de cultura em meio CAYE). Inoculou-se 0,1ml em cada camundongo por via intragástrica. Os camundongos inoculados foram deixados em temperatura ambiente por 4 horas. Foram então sacrificados por asfixia com éter. Abriu-se o abdome e removeu-se cuidadosamente todo o intestino de cada animal de cada lote de camundongo. Estes foram colocados juntos em pequenos pedaços de papel alumínio e pesados, assim como as respectivas carcaças. Consideram-se como positivas as amostras cujos valores para a relação peso dos intestinos/peso das carcaças foram superiores à 0,085.

4.1.3.2. PCR para detecção da toxina STa (OLSVIK et al., 1993).

O procedimento para a reação de PCR foi idêntico ao já descrito no item 4.1.1.3, alterando-se apenas as condições inerentes a composição dos iniciadores e componentes da reação.

Utilizou-se a seguinte sequência de iniciadores:

STa 1- 5' - TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG – 3'

STa 2- 5' - CTT GAC TCT TCA AAA GAG AAA ATT AC – 3',

que amplificam um fragmento de 147 pb.

Para STa:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3µl	1,5mM cada
Iniciadores (10µM cada)	1 – 8,5µl 2 – 9,0µl	0,5 µM cada
DNA – Molde	10µl	-
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0,5µl	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	57µl	
TOTAL	100µl	

Para a amplificação foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

94°C - 1 minuto (desnaturação)

55°C - 1 minutos (anelamento)

72°C - 1 minuto (atividade da Taq DNA Polimerase)

4.1.4. Pesquisa de STb

4.1.4.1. PCR para detecção da toxina STb (OLSVIK et al., 1993).

Utilizou-se a seguinte sequência de iniciadores:

STb 1- 5' - ATC GCA TTT CTT CTT GCA TC – 3'

STb 2- 5' - G GGC GCC AAA GAG AAA ATT AC – 3',

que amplificam um fragmento de 147 pb.

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3µl	1,5mM cada
Iniciadores (10µM cada)	1 – 6,0µl 2 – 6,0µl	0,5 µM cada
DNA – Molde	10µl	-
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0,5µl	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	62,5µl	
TOTAL	100µl	

Para a amplificação foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

94°C - 1 minuto (desnaturação)

60°C - 1 minutos (anelamento)

72°C - 1 minuto (atividade da Taq DNA Polimerase)

4.1.5. Pesquisa de CNF1 e CNF2

4.1.5.1. PCR para detecção das toxinas CNF1 e CNF2 .

O procedimento para a reação de PCR foi idêntico ao já descrito no item 4.1.1.3, alterando-se apenas as condições inerentes a composição dos primers e componentes da reação, que foram indicados pelo Prof. Dr. Jorge Blanco.

Utilizou-se a seguinte sequência de iniciadores :

CNF A- 5' - CTG GAC TCG AGG TGG TGG – 3'

CNF B- 5' - CTG CTG TCA ACC ACA GCC – 3',

que amplificam um fragmento de 533 pb.

Para CNF geral:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10 μ l	1x
10mM dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM cada
Iniciadores (10 μ M cada)	1 – 6,0 μ l 2 – 6,0 μ l	0,5 μ M cada
DNA – Molde	10 μ l	-
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	63 μ l	
TOTAL	100 μ l	

Para a amplificação foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

- 94°C - 1 minuto (desnaturação)
- 65°C - 2 minutos (anelamento)
- 72°C - 1 minuto (atividade da Taq DNA Polimerase)

4.1.6. Pesquisa de Stx1 e Stx2 (OLSVIK et al, 1993)

4.1.6.1. PCR para detecção de Stx1 e Stx2

As condições foram as mesmas descritas no item 4.1.1.3, variando-se aquelas inerentes à composição dos iniciadores e componentes da reação, mostrados a seguir. Assim sendo cada amostra foi tratada da seguinte forma:

Utilizou-se a seguinte sequência de iniciadores:

Stx1 A- 5' - CAG TTA ATG TGG TGG CGA AG – 3'

Stx1 B- 5' - CTG CTA ATA GTT CTG CGC ATC – 3',

que amplificam um fragmento de 894 pb.

Para Stx1:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10 μ l	1x
10mM dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM cada
Iniciadores (10 μ M cada)	1 – 7,0 μ l 2 – 6,5 μ l	0,5 μ M cada
DNA – Molde	10 μ l	-
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	61 μ l	
TOTAL	100 μ l	

Para a amplificação foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

- 94°C - 1 minuto (desnaturação)
- 55°C - 2 minutos (anelamento)
- 72°C - 1 minuto (atividade da Taq DNA Polimerase)

Para Stx2:

Utilizou-se a seguinte sequência de iniciadores:

Stx2 A- 5' - CTT CGG TAT CCT ATT CCC GG – 3'

Stx2 B- 5' - GGA TGC ATC TCT GGT CAT TG – 3',

que amplificam um fragmento de 478 pb.

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10 μ l	1x
10Mm dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM cada
Iniciadores (10 μ M cada)	1 – 6,0 μ l 2 – 6,5 μ l	0,5 μ M cada
DNA – Molde	10 μ l	-
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	62 μ l	
TOTAL	100 μ l	

Para a amplificação foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

94°C - 1 minuto (desnaturação)

55°C - 2 minutos (anelamento)

72°C - 1 minuto (atividade da Taq DNA Polimerase)

4.2. Pesquisa do gene *eae*

4.2.1. PCR

Procedeu-se como já descrito anteriormente para esta técnica, variando-se apenas as condições de reação inerentes a composição dos iniciadores (GANNON et al., 1993) e volume dos componentes.

Utilizou-se a seguinte sequência de iniciadores:

eaeA1 – 5' - ACG TTG CAG CAT GGG TAA CTC – 3'

eaeA2 – 5' - GAT CGG CAA CAG TTT CAC CTG – 3',

que amplificam um fragmento de 815 pb.

Para o gene *eae*:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3µl	1,5mM cada
Iniciadores (10µM cada)	7 µl cada	0,5 µM cada
DNA – Molde	10µl	-
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0,5µl	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	61µl	
TOTAL	100µl	

Para a amplificação foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

94°C - 1 minuto (desnaturação)

56°C - 2 minutos (anelamento)

72°C - 1 minuto (atividade da Taq DNA Polimerase)

4.3. Pesquisa de Intimina

4.3.1 - Western Blot para detecção de intimina geral e intimina β

Foram realizados com a mesma técnica (TOWBIN et al., 1979), mudando-se apenas o anti-soro aplicado em cada teste.

As amostras bacterianas foram semeadas em 5 ml de MEM (Meio Mínimo Essencial- Nutricel) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino. Incubou-se a 37°C por 18 horas, sem agitação. Centrifugou-se por 10 minutos a 12.000 r.p.m. e desprezou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o “pellet” em 300 μ l de tampão de amostra (SDS -4g, Glicerol -20ml, tampão TRIS-HCl 0,5M pH6,8 -40ml, azul de bromofenol – 0,1g, 2mercaptoetanol -5ml, H₂O destilada q.s.p. -100ml). Seguiu-se uma corrida eletroforética dessas amostras, em gel de poliacrilamida a uma concentração de 8%, submetido a uma diferença de potencial de 100V. Após a corrida eletroforética, retirou-se o gel e este foi montado em uma cuba de transferência (Permatron), onde o gel permaneceu voltado para o polo negativo e um filtro de nitrocelulose voltado para o polo positivo, de modo que as proteínas migrassem para o filtro de nitrocelulose (HybondTM-Amersham LIFE SCIENCE). Seguiu-se a transferência por 22 horas, sendo o material submetido a uma diferença de potencial de 30V. Após este período, retirou-se o filtro de nitrocelulose e corou-se com Ponceau S (Ponceau S – 0,5g, ácido acético glacial -1ml, H₂O destilada q.s.p. -100ml) por 5 minutos. Lavou-se com H₂O destilada para a constatação da transferência. Bloqueou-se a reação com PBS 0,01M pH 7,4+ 0,1% de Triton X 100+ 4% de Leite desnatado (Solução Bloqueadora) por 1 hora. Após o bloqueio, o soro anti-intimina diluído 1:1000 na solução bloqueadora foi vertido sobre o filtro de nitrocelulose por 1 hora.

Tratou-se com anticorpo Anti-IgG de Coelho marcada com peroxidase (Horseradish Peroxidase Conjugated Goat - Anti Rabbit IgG - SIGMA) diluída 1:1000 em solução bloqueadora e então lavou-se duas vezes por 20 minutos cada com solução bloqueadora. A reação completou-se com três lavagens de 20 minutos cada. Para a primeira lavagem utilizou-se solução de PBS+Triton X 100 0,5%. As duas lavagens seguintes foram feitas com solução de TRIS-HCl 0,05M pH7,4. Para a visualização do resultado, utilizou-se 1 comprimido de DAB (DAB Peroxidase Tablet Set - SIGMA FASTTM - 3'3'-Diaminobenzidina).

4.3.2- PCR para detecção das intiminas α , β , γ e δ

As amostras de *E. coli* que demonstraram ser positivas para o gene *eae* foram submentidas a reação de PCR, utilizando iniciadores específicos para a identificação dos subtipos α , β , γ e δ (ADU-BOBIE et al., 1998).

A reação obedeceu os parâmetros já descritos para PCR, conforme protocolo abaixo:

Intiminas α e β :

Utilizou-se a seguinte sequência de iniciadores:

α -5' - CCT TAG GTA AGT TAA GT – 3'

β - 5' - TAA GGA TTT TGG GAC CC – 3'

R- 5' - TTT TAC ACA AAG CTG TGC AAT AAG C – 3'

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10 μ l	1x
10 mM dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM cada
Iniciadores (10 μ M cada)	1 – 6,0 μ l 2 – 7,5 μ l	0,5 μ M cada
DNA – Molde	10 μ l	-
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	61 μ l	
TOTAL	100 μ l	

Para a amplificação foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

94°C - 1 minuto (desnaturação)

45°C - 1 minutos (anelamento)

72°C - 3 minuto (atividade da Taq DNA Polimerase)

No caso do subtipo γ , conforme Prof. Dr. L. R. Trabulsi (comunicação pessoal), utilizou-se a temperatura de anelamento a 55°C.

Intimina γ :

Utilizou-se a seguinte sequência de iniciadores:

γ - 5' - ACA AAC TTT GGG ATG TTC – 3'

Ru- 5' - TTT ATT TGC AGC CCC CCA T – 3'

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10 μ l	1x
10 mM dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM cada
Iniciadores (10 μ M cada)	1 – 6,0 μ l 2 – 6,0 μ l	0,5 μ M cada
DNA – Molde	10 μ l	-
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	63 μ l	
TOTAL	100 μ l	

Intimina δ :

Utilizou-se a seguinte sequência de iniciadores:

δ - 5' - TAC GGA TTT TGG GGC AT – 3'

Ru- 5' - TTT ATT TGC AGC CCC CCA T – 3'

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10 μ l	1x
10 mM dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM cada
Iniciadores (10 μ M cada)	1 – 5,5 μ l 2 – 6,0 μ l	0,5 μ M cada
DNA – Molde	10 μ l	-
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	63 μ l	
TOTAL	100 μ l	

4.4. PCR para detecção do local de inserção de LEE

As amostras positivas para o gene *eae* foram submetidas a reação de PCR, utilizando os iniciadores indicados por McDANIEL et al. (1995) e SPERANDIO et al. (1998), que estão descritos à seguir:

K260 – 5' - GAG CGA ATA TTC CGA TAT CTG GTT – 3'

K261 – 5' - CCT GCA AAT AAA CAC GGC GCA T – 3'

K255 – 5' - GGT TGA GTC GAT TGA TCT CTG G – 3'

K295 – 5' - CGC CGA TTT TTC TTA GCC CA – 3'

K296 – 5' - CAT TCT GAA ACA AAC TGC TC – 3'

K913 – 5' - CAT CGG CTG GCG GAA GAT AT – 3'

K914 – 5' - CGC TTA AAT CGT GGC GTC – 3'

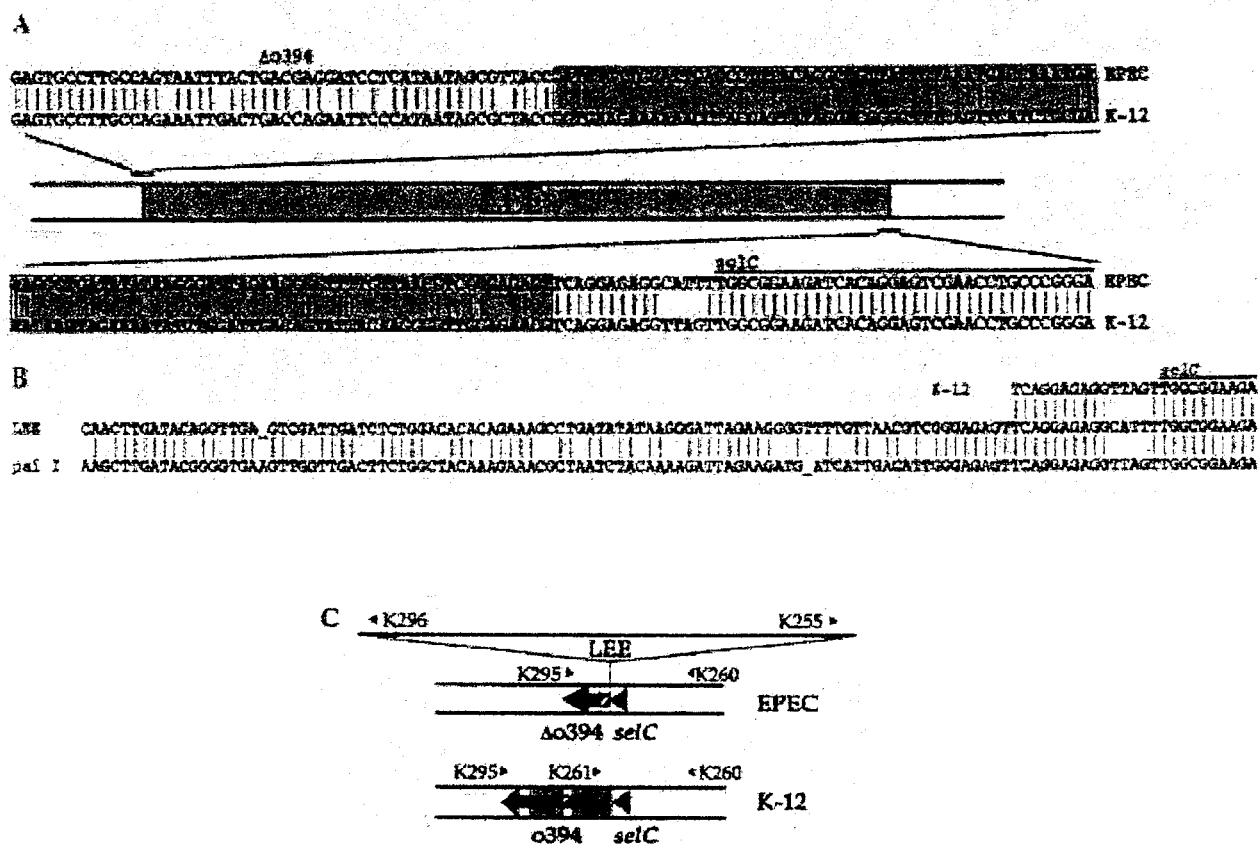
K723 – 5' - GCA ATC GAA GAA AGG GTA AC – 3'

K724 – 5' - GGG GAT ACT TTA GGG GTA T – 3'

K721 – 5' - GAA GGG CTG GCA TGG AAA GC – 3'

K722 – 5' - TTC TGT AGT GAT GTC TCC CT – 3'

Todos os iniciadores foram utilizados da maneira indicada por SPERANDIO et al. (1998).



Esquemas A, B e C são a representação esquemática da região LEE (extraídas de McDANIEL et al., 1995).

Os iniciadores K255 e K296 estão dentro do LEE, enquanto os iniciadores K260, K261 e K295 estão na região do cromossomo de *E. coli* K12. As reações de PCR com os iniciadores K255 e K260 amplificam a junção direita de LEE e os iniciadores K295 e K296 amplificam a junção esquerda de LEE com *selC*, gerando fragmentos de aproximadamente 418 pb em ambas as reações. O iniciador K261 pode anelar-se somente na ausência da inserção de LEE e gera um fragmento de 527 pb junto com o iniciador K260.

Para amplificação de *selC* intacto:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10 μ l	1x
10 mM dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM cada
Iniciador – K260	1 – 8,0 μ l	0,5 μ M cada
Iniciador – K261	2 – 7,5 μ l	
DNA – Molde	10 μ l	-
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	63 μ l	
TOTAL	100 μ l	

Para a amplificação de 527 pb foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

94°C – 1 minuto (desnaturação)

52°C – 1 minuto (anelamento)

72°C – 3 minutos (atividade da Taq DNA Polimerase)

Para inserção na junção esquerda de *selC*:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10 μ l	1x
10 mM dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM cada
Iniciador – K296	1 – 7,0 μ l	0,5 μ M cada
Iniciador – K295	2 – 6,0 μ l	
DNA – Molde	10 μ l	-
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	63 μ l	
TOTAL	100 μ l	

Para a amplificação de 418 pb foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

94°C – 1 minuto (desnaturação)

52°C – 1 minuto (anelamento)

72°C – 3 minutos (atividade da Taq DNA Polimerase)

Para inserção na junção direita de *selC*:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10 μ l	1x
10 mM dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM cada
Iniciador – K255	1 – 7,0 μ l	0,5 μ M cada
Iniciador – K261	2 – 8,0 μ l	
DNA – Molde	10 μ l	-
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	63 μ l	
TOTAL	100 μ l	

Para a amplificação de 418 pb foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

94°C – 1 minuto (desnaturação)

52°C – 1 minuto (anelamento)

72°C – 3 minutos (atividade da Taq DNA Polimerase)

Para amplificação de *pheU* intacto:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10 mM dNTP mixture	2µl	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3µl	1,5mM cada
Iniciador – K913	1 – 7,5µl	0,5 µM cada
Iniciador – K914	2 – 5,5µl	
DNA – Molde	10µl	-
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0,5µl	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	61,5µl	
TOTAL	100µl	

Para a amplificação de 300 pb foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

94°C – 1 minuto (desnaturação)

52°C – 1 minuto (anelamento)

72°C – 2 minutos (atividade da Taq DNA Polimerase)

Para inserção na junção esquerda de *pheU*:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10 μ l	1x
10 mM dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM cada
Iniciador – K721	1 – 7,0 μ l	0,5 μ M cada
Iniciador – K722	2 – 6,0 μ l	
DNA – Molde	10 μ l	-
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	63 μ l	
TOTAL	100 μ l	

Para a amplificação de 1000 pb foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

94°C – 1 minuto (desnaturação)

50°C – 1 minuto (anelamento)

72°C – 2 minutos (atividade da Taq DNA Polimerase)

Para inserção na junção direita de *pheU*:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10 μ l	1x
10 mM dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM cada
Iniciador – K723	1 – 7,5 μ l	0,5 μ M cada
Iniciador – K724	2 – 6,5 μ l	
DNA – Molde	10 μ l	-
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	60,5 μ l	
TOTAL	100 μ l	

Para a amplificação de 800 pb foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

94°C – 1 minuto (desnaturação)

50°C – 1 minuto (anelamento)

72°C – 2 minutos (atividade da Taq DNA Polimerase)

4.5. Adesinas

4.5.1. Aderência às Células HeLa e HEp-2

As provas de aderência as células de linhagem contínua foram realizadas tanto em células HeLa (carcinoma epitelial de cérvix humana, ATCC: CCL2) como em células HEp-2 (carcinoma de laringe humana, ATCC: CCL23). A mesma metodologia de cultivo celular, cultivo das amostras a serem testadas, preparo das microplacas contendo a monocamada celular sobre laminula e a infecção propriamente dita foram desenvolvidas de maneira similar para as 2 linhagens.

As provas foram realizadas com as 52 amostras nas células HeLa e HEp-2.

4.5.1.1. Preparo das Amostras Bacterianas

Na infecção das culturas, as amostras a serem testadas foram cultivadas por 18 horas a 37°C em 3 ml de TSB (Tryptic Soy Broth – Difco).

4.5.1.2. Preparo das Células HeLa e HEp-2

Todas as provas desenvolvidas foram realizadas com as células mantidas e repicadas no Laboratório de Cultivo Celular da área de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IB da UNICAMP, nos procedimentos adotados pelo laboratório sob coordenação da Profa. Dra. Silvia Maria Viccari Gatti.

A Metodologia utilizada foi a descrita por SCALETISKY et al. (1984) com algumas modificações. As células foram cultivadas em microplacas (Falcon, USA) com 24 orifícios em atmosfera de CO₂, contendo 1 ml de meio Eagle (M.E.M.)

acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (50% de penicilina e 50% de estreptomicina).

A estas microplacas previamente foram colocadas lamínulas de 10x7mm estéreis em cada orifício.

O crescimento das monocamadas foi acompanhado pela observação após 24-48 horas em microscópio invertido.

A cultura era considerada ideal para o teste quando as células apresentavam 50% ou mais da área da lamínula recoberta e se apresentavam baixa refringência, sem deslocamento.

4.5.1.3. Teste de Adesão

O meio Eagle contido nos orifícios das microplacas foi retirado com o auxílio de micropipetas de 1000µl com ponteiros estéreis. As células foram lavadas com tampão PBS pH7,4 – 0,01M estéril por 3 vezes para que todos os resíduos de soro fetal bovino e antibióticos fossem retirados. A cada orifício foram adicionados 1 ml de meio Eagle acrescido de 1% de D-manose (Difco), inoculando-se em seguida 40µl do cultivo da amostra a ser testada. Todas as amostras foram testadas em duplicata, ou seja, 2 orifícios para cada amostra.

As microplacas contendo as amostras foram incubadas por 3 horas a 37°C e em seguida foram novamente lavadas com o mesmo tampão por 10 vezes para remover as bactérias que não aderiram. Após esta lavagem as lamínulas foram fixadas pela adição de 1 ml de Metanol P.A. por orifício, à temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida coradas com May-Grunwald a 10% por 5 minutos e Giensa a 5% por 20 minutos.

O resultado da aderência e o seu tipo, quando presente, foi observado em microscópio óptico, inicialmente com um aumento de 320x e em seguida sob objetiva

de imersão. Os critérios para definição do tipo de adesão utilizados foram os descritos por SCALETISKY et al. (1988), NATARO et al. (1985) e LEVINE (1987).

Amostras controle para cada tipo de adesão, assim como amostra controle negativo foram incluídas em todos os testes realizados.

4.5.1.4. Teste de Adesão com Seis Horas de Incubação

Realizou-se o teste com 6 horas para as células que apresentaram adesão do tipo não característica, assim como as que não apresentaram adesão com 3 horas de incubação. A metodologia assemelha-se à empregada com 3 horas, sendo que após o período de incubação de 3 horas, o meio de cultivo foi retirado, os orifícios foram lavados por 3 vezes com PBS estéril e meio Eagle acrescido de 2% de soro fetal bovino foi repostado na quantia de 1 ml em cada orifício. Realizou-se nova incubação por 3 horas na temperatura de 37°C e em seguida utilizou-se a mesma metodologia para fixar, corar e observar as células.

4.5.2. PCR para detecção de *eaf* (FRANKE et al., 1994)

Utilizou-se a seguinte sequência de iniciadores:

EAF1- CAG GGT AAA AGA AAG ATG ATA A

EAF25- TAT GGG GAC CAT GTA TTA TCA,

que amplificam um fragmento de 397 pb.

Realizado sob as seguintes condições:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10 μ l	1x
10Mm dNTP mixture	2 μ l	0,2mM cada
50mM MgCl ₂	3 μ l	1,5mM cada
Iniciadores (10 μ M cada)	1 – 9,0 μ l 2 – 7,5 μ l	0,5 μ M cada
DNA – Molde	10 μ l	-
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O Milli-Q estéril	58 μ l	
TOTAL	100 μ l	

Para a amplificação foram utilizados 30 ciclos com as seguintes temperaturas:

- 94°C - 1 minuto (desnaturação)
- 54°C - 1 minutos (anelamento)
- 72°C - 1 minuto (atividade da Taq DNA Polimerase)

4.5.3. Microhemaglutinação Manose-Resistente (MHMR)

As amostras a serem testadas para hemaglutinação, utilizando metodologia de OLIVEIRA et al., (1981), foram cultivadas por 18 horas, utilizando os meios CFA, Minca e Mínimo.

Para a reação propriamente dita, segundo técnica de JONES & RUTTER (1974), com algumas modificações, foram utilizadas placas de microtítulo de fundo em “U”. Adicionou-se na primeira fileira (A) da placa de microtítulo, 100µl de PBS acrescido de 0,5% de D-Manose, nas demais fileiras, adicionou-se 50µl do mesmo Tampão. Com um palito estéril, fez-se um raspado na cultura da amostra a ser testada e diluiu-se esse raspado na primeira concavidade da placa de microtítulo. Fez-se a diluição da amostra a partir da primeira concavidade, até a última, desprezando os 50µl finais. Assim, da primeira até a última concavidade, teremos as seguintes diluições: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256. Após a diluição, acrescentou-se 50µl da hemácia a ser testada, lavada duas vezes em salina 0,15M (10 minutos a 1800 r.p.m.) e uma vez com o tampão PBS (10 minutos a 1800 r.p.m.) e diluída a 1% em tampão PBS + 0,5% de D-Manose. Agitou-se levemente e levou-se à 4°C por 1 hora. Após este período, realizou-se a leitura , onde as hemácias que formavam uma rede depositada no fundo da concavidade indicavam reação positiva para aquela concentração de bactérias. Onde houve depósito de hemácias, sob a forma de “botão”, o teste foi considerado negativo. As hemácias utilizadas foram humana, bovina, equina, de cobaia e de galinha.

4.6. Determinação do Antígeno O

A sorogrupagem das amostras foi realizada com os anti soros O2, O8, O9, O15, O20, O26, O45, O49, O64, O78, O101, O103, O109, O115, O128, O132, O138, O139, O141, O147, O149, O153, O157 segundo metodologia de GUINÉE et al. (1972), com algumas modificações. As amostras foram cultivadas em TSA (Difco) e incubadas a 37°C por 18 horas. Foram ressuspensas em salina estéril, ajustadas para $1,8 \times 10^9$ bactérias por ml com a mesma solução, segundo o tubo 6 da escala de Mac Farland. O antígeno O foi preparado aquecendo-se a suspensão por 1h a 100°C para destruição dos antígenos capsulares (K) e flagelar (H), e por 2,5h a 121°C para testes com anti-soros preparados contra os antígenos O8, O9, O20 e O101, para inativação do antígeno K do tipo A. Estes antígenos recobrem o antígeno O e impedem sua reação com o anti-soro. Adicionou-se ao antígeno O preparado, igual volume de salina formalinizada contendo violeta de genciana a 0,005%. Misturou-se 50µl de antígeno e 50µl de anti-soro diluído 1/80 em salina estéril contendo azida sódica (1g/1000ml), em orifícios de fundo em “V” de placas de microtítulo de 96 orifícios. A leitura era feita após incubação das placas a 37°C, por 18h. Reações positivas para determinado anti-soro apresentavam-se como amostras em suspensão e reações negativas apresentavam-se com um depósito em forma de “botão” no fundo do orifício.

4.7. Determinação do Antígeno H

Utilizou-se amostras crescidas por 18 horas à 37°C em caldo simples e formalizadas pela adição de um igual volume de 0,5% de cloreto de sódio com 0,6% de formalina. Estas soluções foram testadas com anti-soros H em “pools”.

Foram utilizados 10 “pools”, onde cada um continha 5 ou 6 anti-soros H, com exceção do “pool” 10, que continha 4 anti-soros:

- “Pool”:
1. H: 1, 2, 3, 12, 16
 2. H: 4, 5, 6, 9, 17
 3. H: 8, 11, 21, 40, 43
 4. H: 7, 10, 14, 15, 18
 5. H: 19, 20, 23, 24, 25
 6. H: 26, 27, 28, 29, 31
 7. H: 30, 32, 34, 36, 41
 8. H: 33, 35, 37, 38, 45
 9. H: 39, 42, 44, 46, 47
 10. H :48, 49, 50, 51

Um mililitro da suspensão do antígeno desconhecido foi adicionado ao anti-soro H, resultando em uma solução final de 1:1000. Os testes foram incubados em Banho-Maria à 48-50°C e a leitura foi realizada após períodos de 15 minutos, 30 minutos e 1 hora. Quando ocorria aglutinação com 1 dos “pools”, o teste era refeito, desta vez com todos os anti-soros contidos naquele “pool”, em separado.

4.8. “Fluorescence Actin Staining Test” (FAS)

O teste de FAS é utilizado para detectar a polimerização da actina sob os locais onde a bactéria se adere (SHARIFF et al., 1993).

Realizou-se o teste com cultivos das amostras 309, 326, 340 e 44.4 em meio TSB, incubados a 37°C por 18 horas. Lavou-se 3 vezes com tampão PBS estéril a monocamada celular (Células HEp-2) resultante de 48 horas de crescimento em microplacas de 24 concavidades contendo lamínulas. Em cada concavidade adicionou-se 1 ml de M.E.M., suplementado com soro fetal bovino a 2% e 1% de D-Manose. Em seguida adicionou-se a amostra bacteriana crescida em TSB, na quantidade de 35µl, sendo uma amostra por concavidade. Incubou-se a placa por 3 horas a 37°C em estufa de CO₂. Lavou-se a placa 2 vezes com tampão PBS estéril. Colocou-se novamente 1 ml de M.E.M. suplementado com soro fetal bovino a 2% e D-Manose a 1%. Levou-se novamente a estufa de CO₂ a 37°C por mais 3 horas. Realizou-se a fixação, retirando-se o M.E.M., lavando-se a placa 3 vezes com tampão PBS e adicionando-se a cada orifício 1 ml de formalina (PBS - 100ml + Formaldeído 37% - 8ml). Deixou-se por 30 minutos e seguiu-se a coloração. Lavou-se a placa por 3 vezes com tampão PBS. Permeabilizou-se a membrana celular bacteriana com 1 ml de Triton X-100 (SIGMA) diluído a 1% em tampão PBS , por 4 minutos a temperatura ambiente. Lavou-se novamente 3 vezes com tampão PBS e corou-se com 10µl de uma solução de 5µg/ml de PHALLOIDIN – FITC Labeled (SIGMA) por 30 minutos, a temperatura ambiente, em câmara escura. O resultado

positivo é obtido pela observação da actina polimerizada sob os locais onde a bactéria se aderiu.

IX. Resultados

1. Pesquisa de enterotoxina LT-I

Mediante leitura das lâminas e placas, observamos que os sobrenadantes de cultivo de nenhuma das amostras provocou formação de halo de hemólise em nos dois testes realizados: Imuno Hemólise Radial e Imuno Hemólise Radial Modificado, o que pode ser confirmando com o teste de PCR, o qual não amplificou os iniciadores utilizados para a detecção da toxina LT-I. Portanto, nenhuma amostra de *E. coli* de origem bovina estudada produziu enterotoxina LT-I.

2. Pesquisa de enterotoxina LT-II através de PCR

Apenas a amostra 280 apresentou amplificação do gene que codifica a enterotoxina LT-II (Figura 1). Portanto, somente em 1 amostra foi detectado o genótipo para a produção de LT-II.

3. Pesquisa das toxinas STa, STb, CNF1, CNF2, Stx1 e Stx2

O teste do camundongo recém nascido não detectou nenhuma amostra STa positiva. Obtivemos um total de 52 amostras negativas para a produção desta toxina, representando 100% das amostras testadas, o que foi confirmado pelo teste de PCR. Em adição, nenhuma das amostras testadas em PCR para detecção do gene que codifica para a toxina STb tiveram resultado positivo.

Todas as amostras testadas em PCR foram negativas para a detecção dos genes que codificam para a produção das toxinas CNF1, CNF2, Stx1, ou Stx2.

4. Teste de Adesão em Células HEp-2

As amostras com resultado positivo para aderência em células HEp-2, com 3 horas de incubação, bem como o tipo de adesão apresentada encontram-se na tabela 1. Um total de 31 amostras positivas foram obtidas neste teste, o que representa 59,61% do total de amostras. Destas, 16 (51,61%) apresentaram “Adesão Não Característica”, categoria que classifica amostras que não conseguiram ter seu padrão de adesão definido com este teste, ou por apresentarem adesão insuficiente ou por mostrarem mais de um tipo de adesão no mesmo teste. Outro tipo de adesão encontrado foi “Cover Slip”, ou “ Adesão Agregativa na Laminula”, com 1 amostra, representado 3,22% das amostras positivas. Foram observadas 8 amostras do tipo “Agregativa” (25,81%) e 5 amostras com “Aderência Difusa” (16,13%) e 1 amostra com adesão do tipo “Localizada-like” (3,22%).

As amostras com resultado negativo e as amostras que apresentaram aderência do tipo “Não Característica no teste com 3 horas de incubação foram novamente

testadas, incubando-se estas amostras por 6 horas. Resultados estão apresentados na tabela 1. Vinte amostras positivas foram obtidas neste teste, o que representa 57,14% de positividade. Destas, 10 amostras apresentaram “Aderência Agregativa” (50%) (Figura 3), 5 amostras apresentaram “Aderência Difusa” (25%) (Figuras 5 e 7), 4 apresentaram “Aderência Não Característica” (20%) e a amostra 44.4 (5%) apresentou adesão do tipo “Localizada-like” (Figura 6). Apesar de apresentarem resultado negativo, as amostras 326 e 340 encontram-se na tabela por apresentarem o gene *eae*.

5. Teste de Adesão em Células HeLa

Os resultados referentes ao teste de adesão em células HeLa encontram-se na tabela 1, sendo que , nas 52 amostras testadas com 3 horas de incubação foram obtidas 29 amostras positivas, representando 55,76% do total de amostras testadas. Destas, 5 apresentaram “Aderência Difusa” (17,24%) (Figura 4), 2 amostras apresentaram “Aderência Agregativa” (6,90%) (Figura 2), 21 amostras apresentaram “Aderência Não Característica” (72,41%) e 1 amostra apresentou aderência do tipo “Cover Slip” (3,45%). As amostras negativas e as amostras que apresentaram adesão do tipo “Não Característica” foram testadas com 6 horas de incubação. Vinte e duas amostras tiveram resultado positivo (53,66%), sendo que 2 amostras apresentaram “Aderência Difusa” (9,09%), 4 apresentaram “Aderência Agregativa” (18,18%) e 16 apresentaram “Aderência Não Característica” (72,73%). Apesar de apresentarem resultado negativo para este teste, as amostras 309, 326, 340 e 44.4 também foram incluídas na tabela 1 por apresentarem resultado positivo para o gene *eae* no teste de PCR.

6. Teste de PCR para detecção do gene *eaf*.

Nenhuma das amostras amplificou o gene que codifica para EAF, demonstrando que as amostras são todas negativas para este fator de virulência.

7. Microhemaglutinação Manose-Resistente (MHMR).

Observamos nos resultados que a quase totalidade das amostras microhemaglutinantes reagiram apenas com hemácias humanas, geralmente em títulos baixos, até 1:16, com exceção das amostras 309, 340, 348 e B que reagiram até 1:32; as amostras 305, 327 e 3262 que reagiram até a diluição 1:64 e as amostras 303, 304 e 343, que reagiram em diluições maiores compreendidas entre 1:128 e 1: 256.

8. Teste de PCR para detecção do gene *eae*

Das 52 amostras testadas, 4 tiveram resultado positivo para o gene *eae*, a saber: 309, 326, 340 e 44.4. Estes resultados encontram-se na Tabela 2 e na Figura 8.

9. Western Blot para detecção de intimina

As 4 amostras que tiveram resultado positivo para o gene *eae* pelo teste de PCR foram examinadas pelo Western Blot para pesquisa de Intimina. Todas as

quatro amostras (309, 326, 340 e 44.4), tiveram resultado positivo também para a produção desta proteína. Estes resultados também se encontram na tabela 2, para fins de comparação com outros achados e na Figura 10.

10. Determinação dos subtipos de intimina (α , β , γ e δ)

As amostras 326, 340 e a amostra 44.4 foram positivas para a intimina β e negativas para as intiminas α , γ e δ , reações que podem ser consideradas válidas uma vez que os padrões positivo e negativo funcionaram perfeitamente no teste de PCR (Figura 9). A amostra 309 não amplificou com nenhum dos iniciadores testados, indicando que não pertence aos 4 subtipos de intimina. Estes resultados foram confirmados pelo teste de Western blot realizados com os anti-soros anti-intimina α e anti intimina β , sendo que nenhuma amostra reagiu com o primeiro anti-soro e as amostras 326, 340 e 44.4 reagiram com o anti soro β (Figura 11).

11. Sorogrupagem

Realizado em nosso laboratório para antígeno O e confirmado no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Veterinária da Universidade de Santiago de Compostela - Lugo - Espanha, que também realizou o teste para detecção do Antígeno H com as amostras *eae* positivas. O Antígeno H foi determinado pelo teste de aglutinação recomendado por EWING, 1986. Os resultados estão apresentados na tabela 2.

12. Teste de FAS

A amostra 309 apresentou resultado positivo para bactérias isoladas e para grupos bacterianos. O aspecto das manchas foi característico. As amostras 326 e 340 tiveram resultado negativo para este teste, devendo-se levar em consideração o fato destas amostras não terem apresentado adesão às células HeLa e HEp-2. A amostra 44.4 apresentou uma aderência intensa às células HEp-2, em padrão de aderência localizada-like, com resultado positivo para o teste de FAS (Tabela 2).

13. Pesquisa do local de inserção de LEE

As amostras 309, 326 e 44.4, testadas em PCR, amplificaram aproximadamente 527 pares de base (pb), indicando ser esta banda, o *selC* intacto, ou seja, em outras palavras, o LEE não está inserido neste gene. A amostra 340, neste mesmo teste, amplificou cerca de 860 pb, o que necessita de outras investigações para podermos explicar este fato (Figura 12).

Quando estas mesmas amostras foram testadas pela Profa. Dra. Tania Tardelli Gomes, da E.P.M., para verificar se ocorria inserção em *pheU*, a amostra 309 amplificou *pheU* intacto, com cerca de 300pb. As amostras 326 e 44.4 amplificaram bandas com número de pb maior que o número de pb das inserções nas junções direita e esquerda de *pheU*. A amostra 340 apresentou duas bandas, sendo que uma delas tinha o mesmo número de pb das amostras 326 e 44.4, e a outra banda tinha o número de pb intermediário entre o da amostra padrão negativo e o da outra banda apresentada (dados não apresentados). Estes dados também necessitam de outras investigações.

Tabela 1. Resultado dos Testes de Adesão em células HEp-2 e HeLa.

Amostra	Célula HEp-2 3h de incubação	Célula HEp-2 6h de incubação	Célula HeLa 3h de incubação	Célula HeLa 6h de incubação
211	N	N	N	N
214	NC	NC	NC	NC
216	N	N	N	N
225	AD	-	AD	-
227	NC	AA	AA	-
230	N	AD	N	N
243	AD	-	AD	-
262	AD	-	AD	-
278	NC	*	NC	*
279	AA	-	AA	-
280	NC	AA	NC	AA
303	NC	AA	NC	AA
304	N	N	N	N
305	N	N	N	N
309	N	AD	N	N
313	N	N	N	N
314	NC	AA	NC	AA
315	NC	AA	NC	AA
316	N	N	N	N
318	*	-	*	-
325	NC	AA	NC	NC
326	N	N	N	N
327	N	AA	N	N
330	N	AD	N	AD
331	AA	-	NC	NC

Tabela 1. (continuação)

Amostra	Célula HEp-2 3h de incubação	Célula HEp-2 6h de incubação	Célula HeLa 3h de incubação	Célula HeLa 6h de incubação
334	AA	-	NC	NC
337	N	N	N	N
338	CL	-	CL	-
339	AA	-	NC	NC
340	N	N	N	N
341	AA	-	NC	NC
342	AA	-	NC	NC
343	AA	-	NC	NC
344	AA	-	NC	NC
345	N	N	NC	NC
347	NC	AA	NC	NC
348	AD	-	AD	-
349	AD	-	AD	-
350	N	N	N	N
351	N	N	NC	NC
3254	NC	AA	NC	NC
3262	N	N	N	N
3263	*	-	*	-
3265	N	AD	NC	NC
M3	NC	AA	NC	NC
M4	NC	*	*	-
M8	NC	AD	N	N
B	NC	NC	N	AD
P	NC	NC	N	N
Hol	N	N	N	N
G5	NC	NC	NC	NC
44.4	LL	LL	N	N

Legenda da Tabela 1:

*: Amostras inviáveis para o teste de aderência, pois mesmo após várias tentativas não obtivemos sucesso em manter o tapete celular durante o teste.

-: Amostras não testadas.

N : Negativa.

NC: Não Característica.

AD: Aderência Difusa.

AA: Aderência Agregativa.

CS: “Cover Slip”.

LL: “Localizada-like”.

Tabela 2: Resultados positivos para o gene *eae*, produção de intimina e sorogrupagem:

AMOSTRA	PCR PARA DETECÇÃO DO GENE <i>eae</i>	WESTERN BLOT PARA DETECÇÃO DE INTIMINA	PCR PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO DE INTIMINA	SOROGRUPAGEM
211	negativo	-	-	O33
214	negativo	-	-	O8
216	negativo	-	-	NT
225	negativo	-	-	O17
227	negativo	-	-	O15
230	negativo	-	-	O33
243	negativo	-	-	O17
262	negativo	-	-	O117
278	negativo	-	-	O117
279	negativo	-	-	O33
280	negativo	-	-	O8
303	negativo	-	-	O153
304	negativo	-	-	O153
305	negativo	-	-	O89
309	positivo	positivo	-	O103:H32
313	negativo	-	-	O9
314	negativo	-	-	O8
315	negativo	-	-	O64
316	negativo	-	-	O15
318	negativo	-	-	O117
325	negativo	-	-	O8
326	positivo	positivo	Intimina β	NT:H11
327	negativo	-	-	O33
330	negativo	-	-	O80
331	negativo	-	-	O80
334	negativo	-	-	O21
337	negativo	-	-	NT
338	negativo	-	-	O26
339	negativo	-	-	NT
340	positivo	positivo	Intimina β	O123:H11

Tabela2: (continuação)

AMOSTRA	PCR PARA DETECÇÃO DO GENE <i>eae</i>	WESTERN BLOT PARA DETECÇÃO DE INTIMINA	PCR PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO DE INTIMINA	SOROGRUPAGEM
341	negativo	-	-	O12
342	negativo	-	-	O12
343	negativo	-	-	O73
344	negativo	-	-	O21
345	negativo	-	-	O110
347	negativo	-	-	O110
348	negativo	-	-	O73
349	negativo	-	-	O110
350	negativo	-	-	O20
351	negativo	-	-	O20
M4	negativo	-	-	O117
3254	negativo	-	-	NT
3262	negativo	-	-	O33
3263	negativo	-	-	O117
3265	negativo	-	-	NT
Hol	negativo	-	-	NT
G5	negativo	-	-	O127
M8	negativo	-	-	O86
P	negativo	-	-	O36
B	negativo	-	-	O6
M3	negativo	-	-	NT
44.4	positivo	positivo	Intimina β	O26:H

NT: Amostra não Tipável

- : Amostra não testada

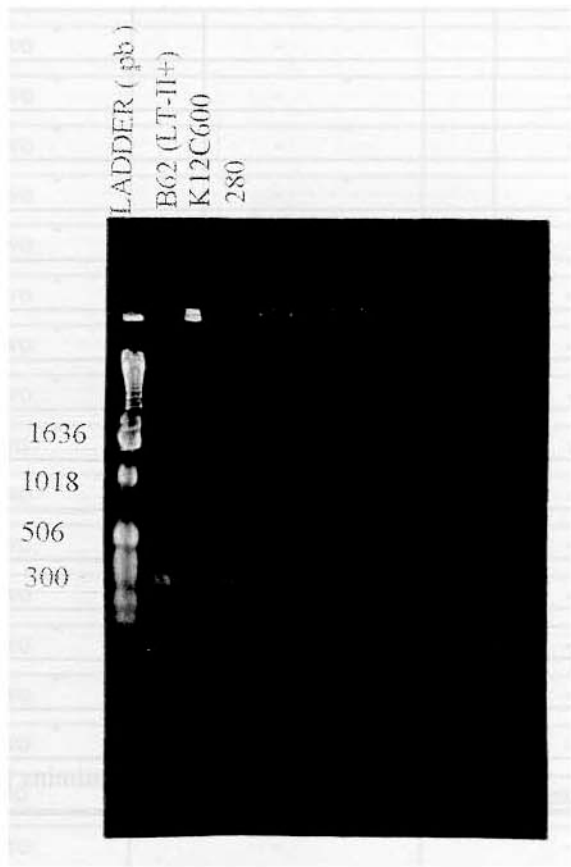


Figura 1. Resultado do teste de PCR para detecção da enterotoxina LT-II na amostra 280

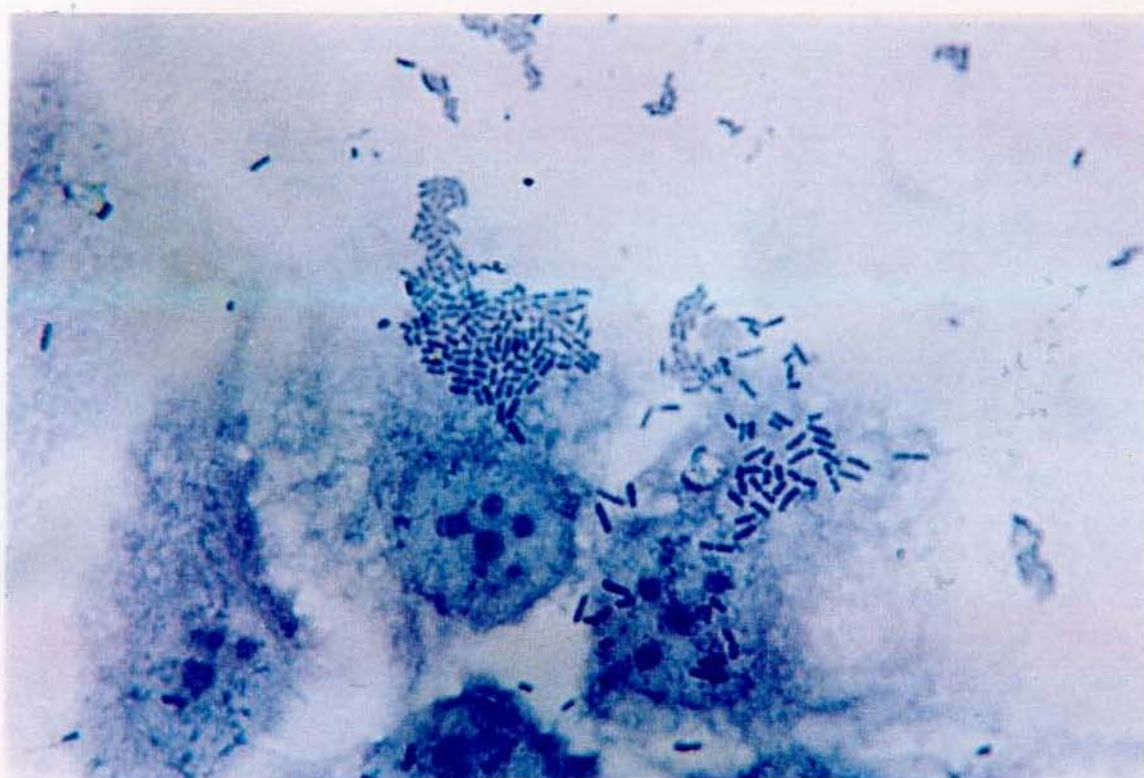


Figura 2. Amostra 227 - 3 horas de incubação em células HeLa - Enteroagregativa

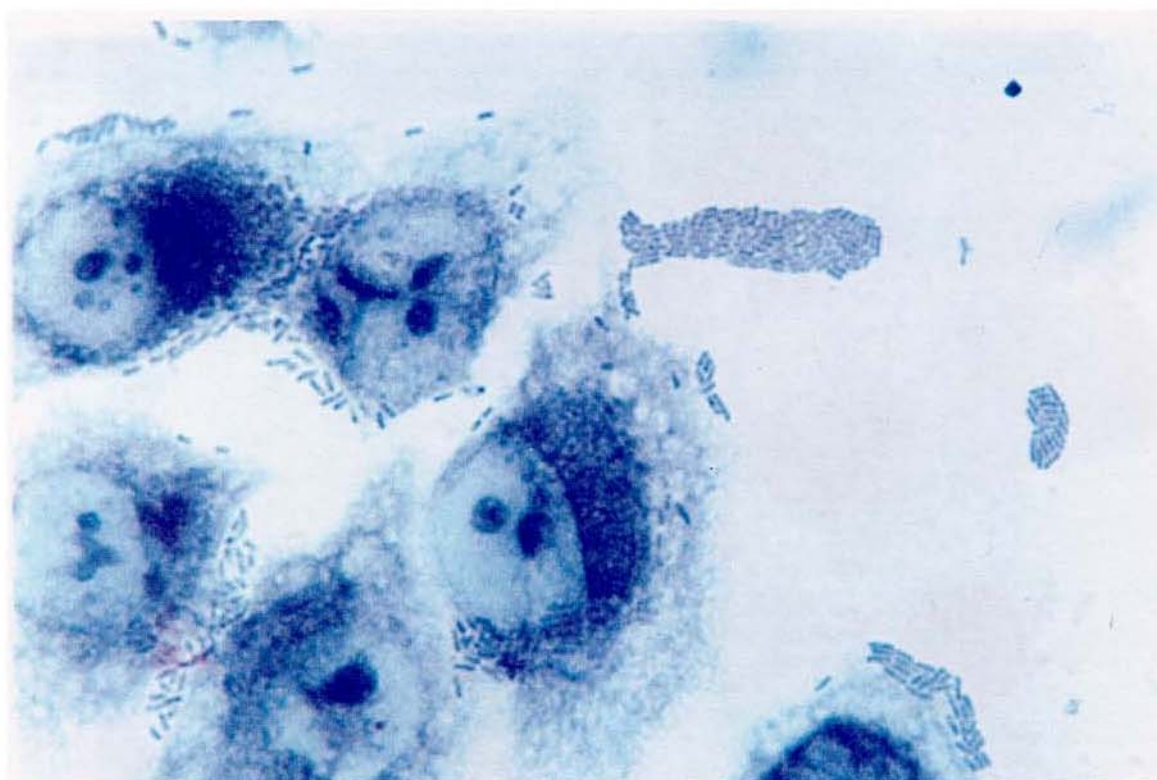


Figura 3. Amostra 227 - 6 horas de incubação em células HEp-2 - Enteroagregativa

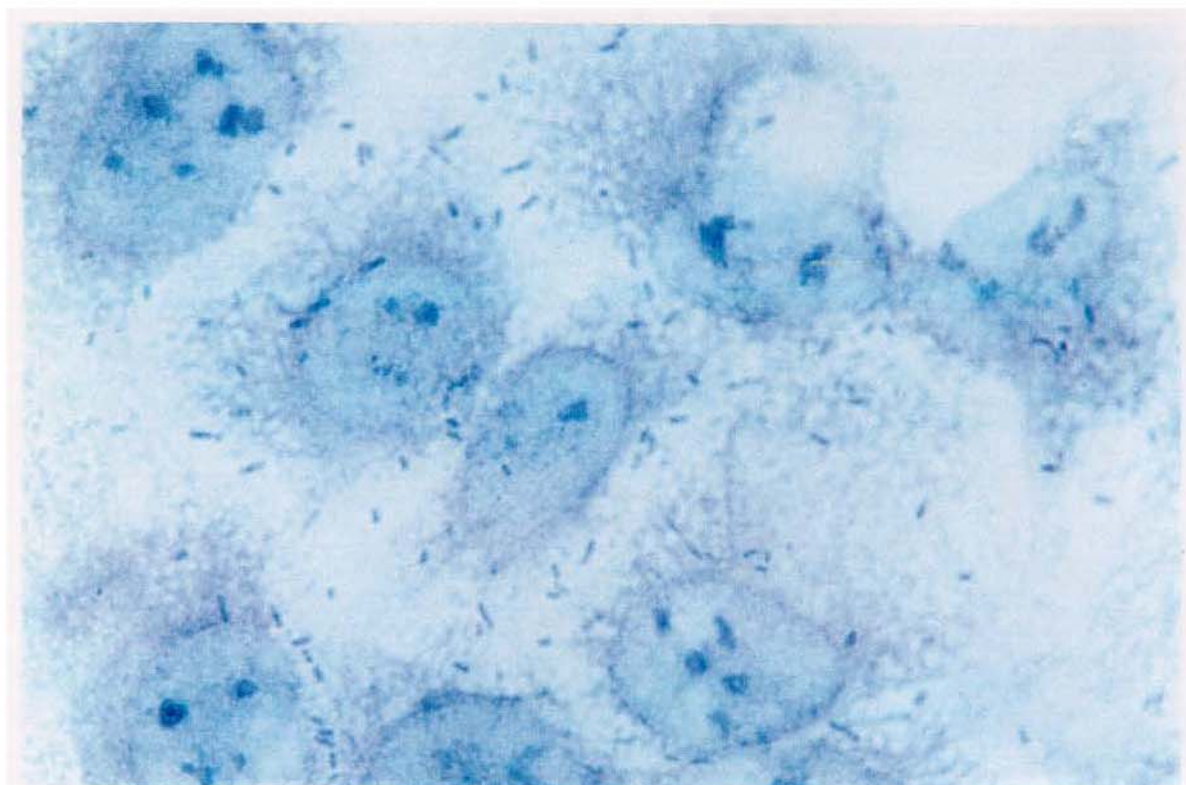


Figura 4. Amostra 262 - 3 horas de incubação em células HeLa – Aderência difusa

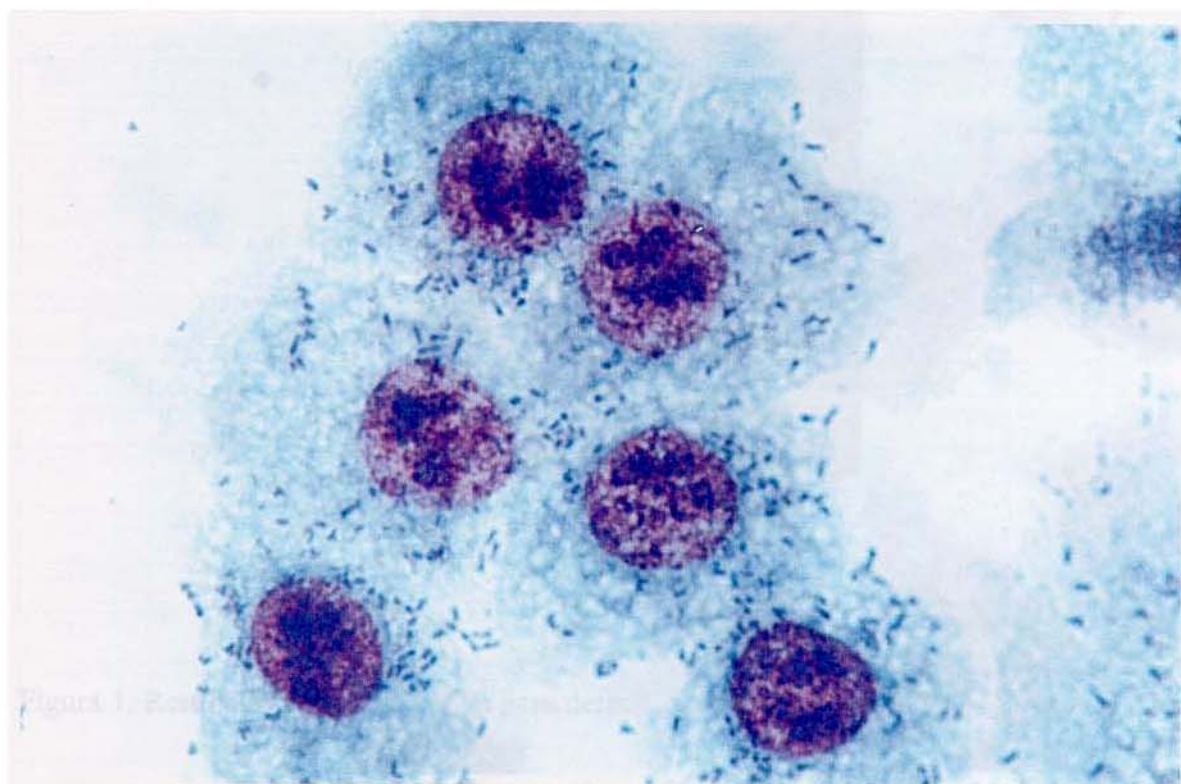


Figura 5. Amostra 262 - 3 horas de incubação em células HEp-2 – Aderência difusa

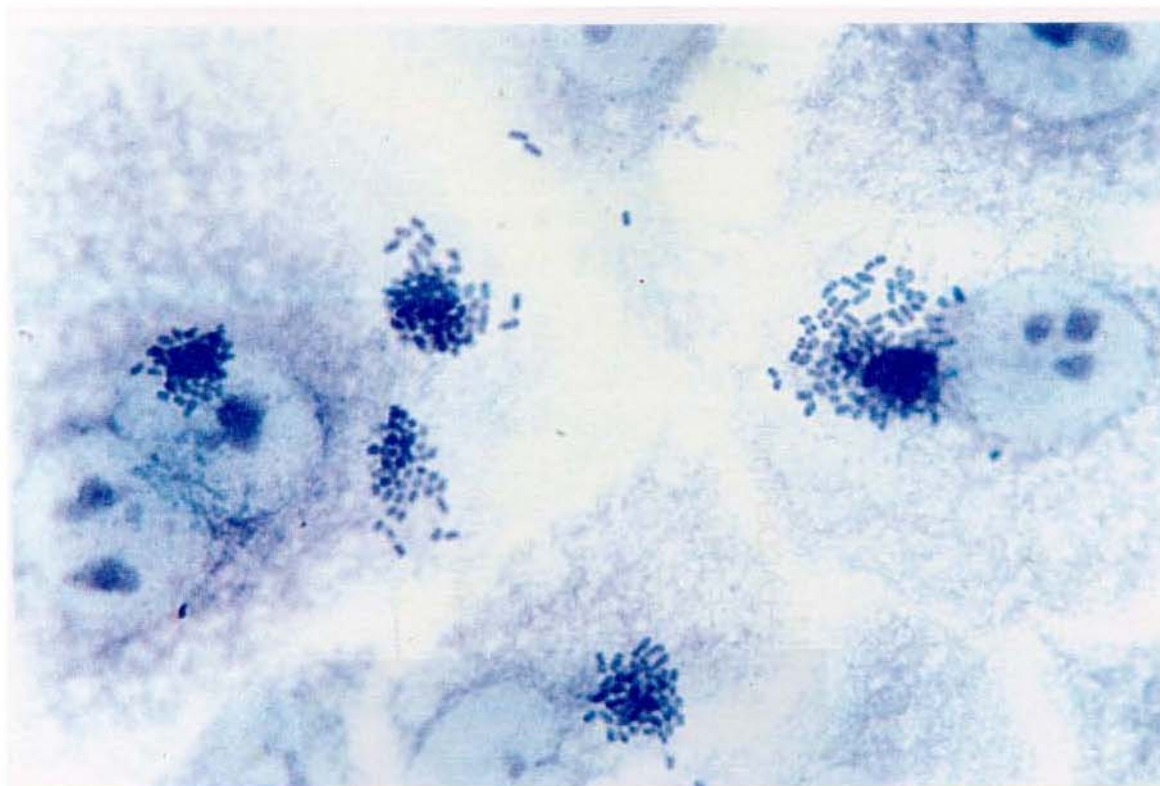


Figura 6. Amostra 44.4 – 6 horas de incubação em células HEp-2 – Aderência localizada-like

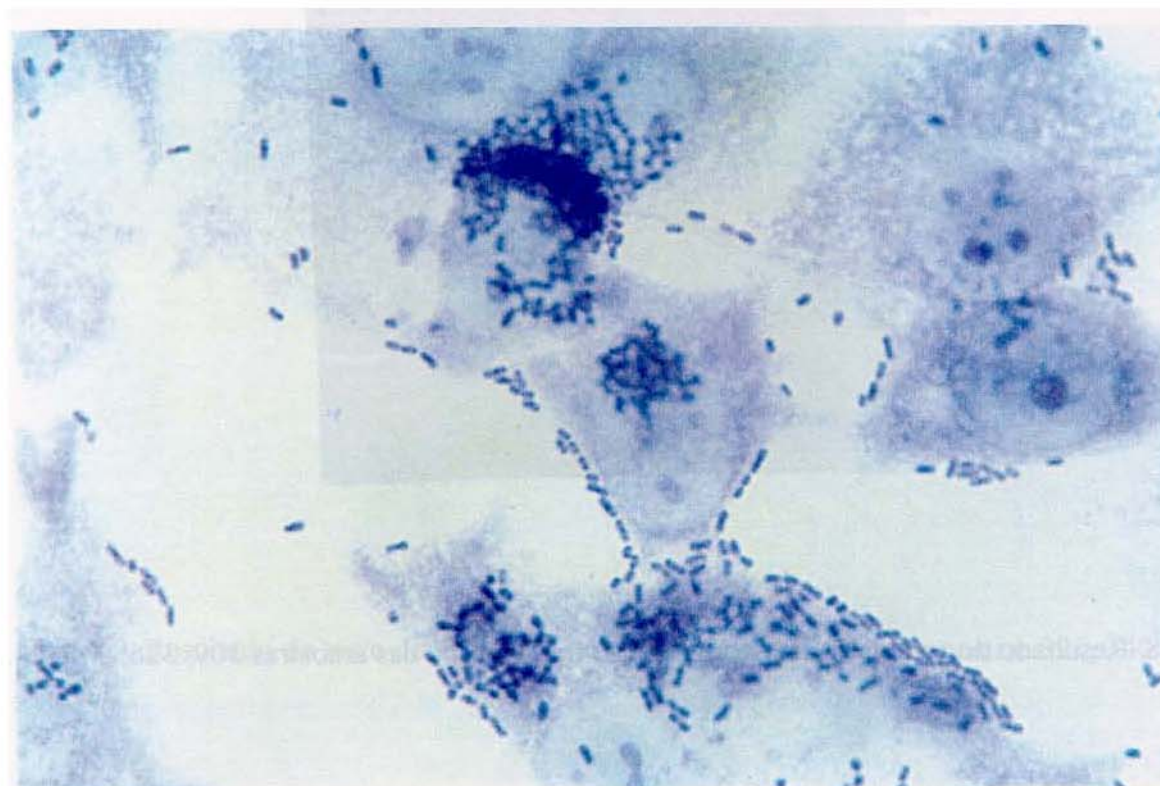


Figura 7 . Amostra 309 – 6 horas de incubação em células HEp-2 – Aderência Difusa

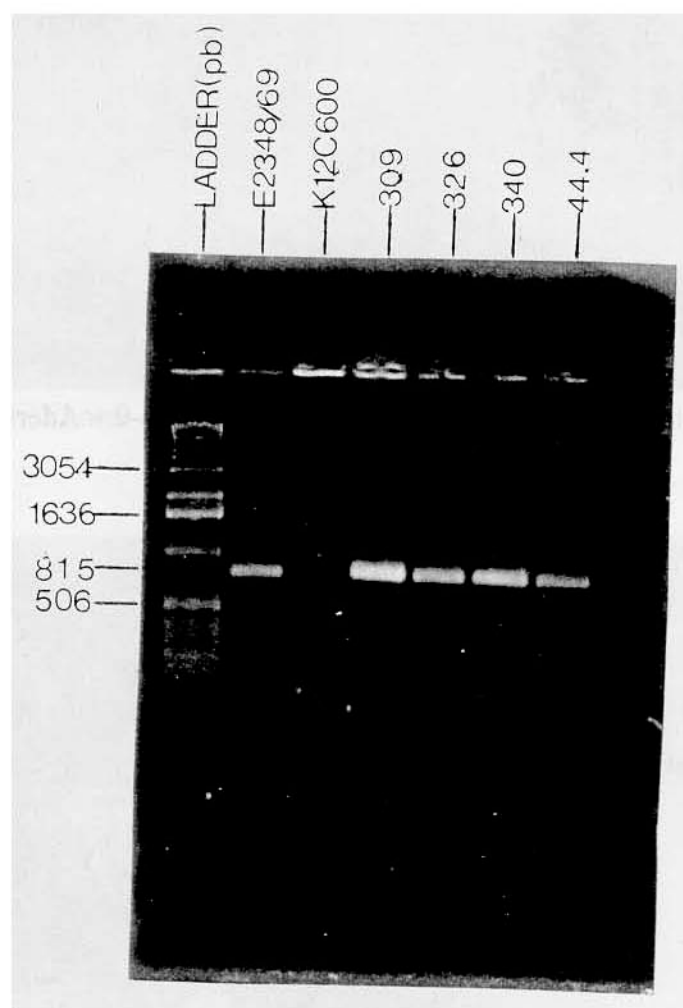


Figura 8. Resultado do teste de PCR para detecção do gene *eae* das amostras 309, 326, 340, 44.4.

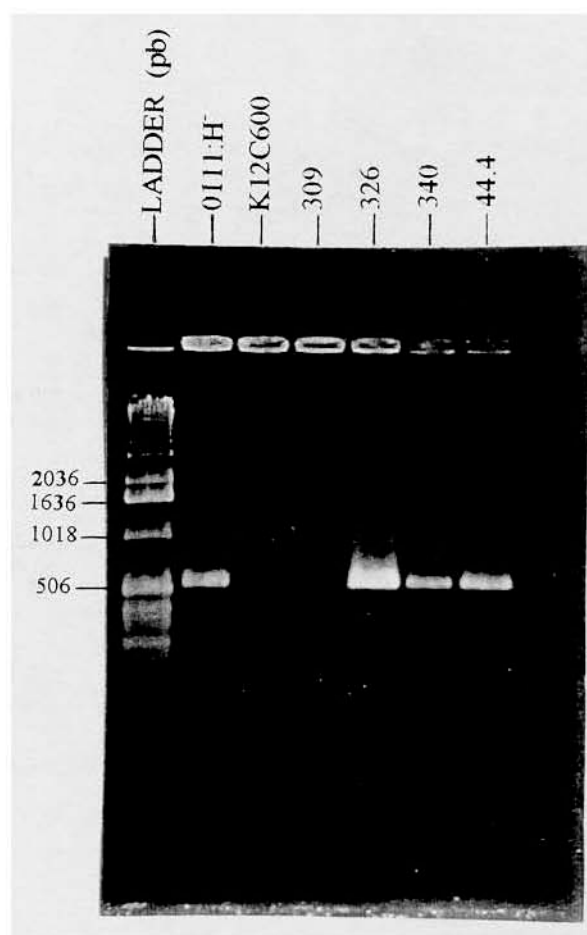


Figura 9. Resultado do teste de PCR para detecção da intimina β das amostras 326, 340 e 44.4.

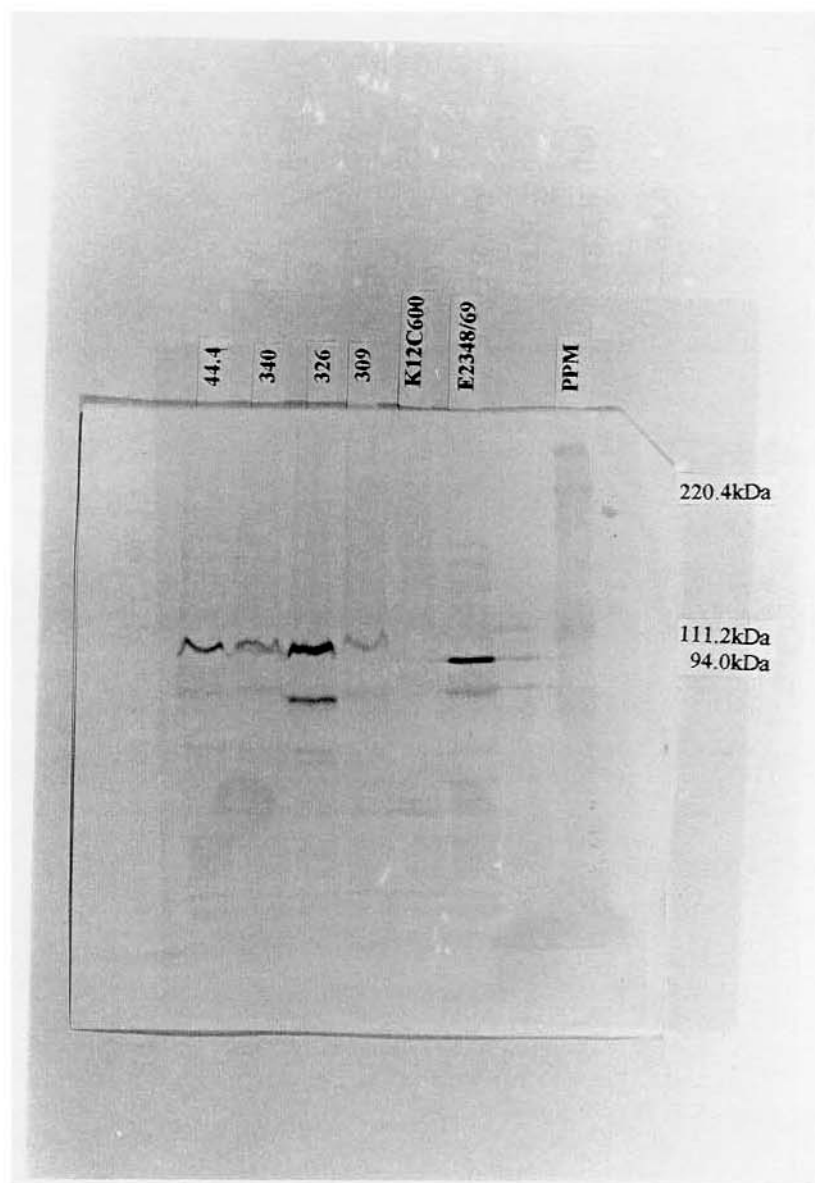


Figura 10. Resultado do teste de Western blot para detecção de intimina das amostras 309, 326, 340 e 44.4.

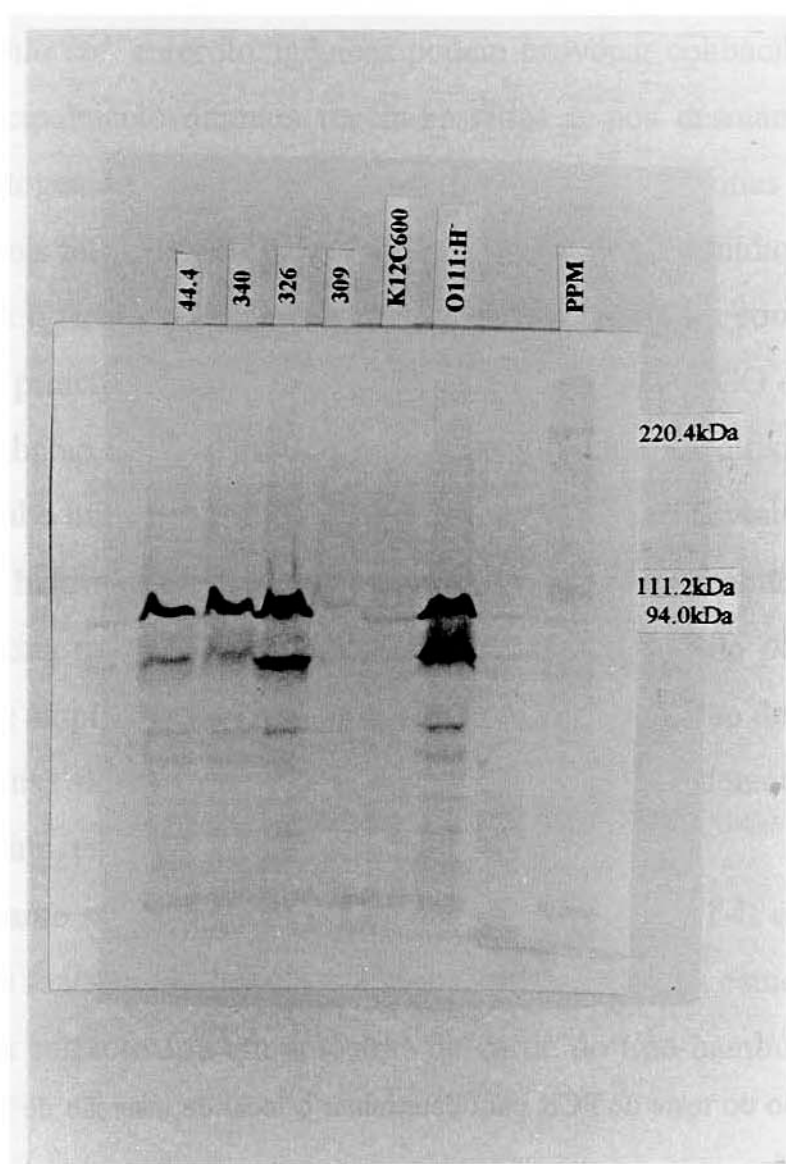


Figura 11. Resultado do teste de Western blot para detecção de intimina β das amostras 326, 340 e 44.4.

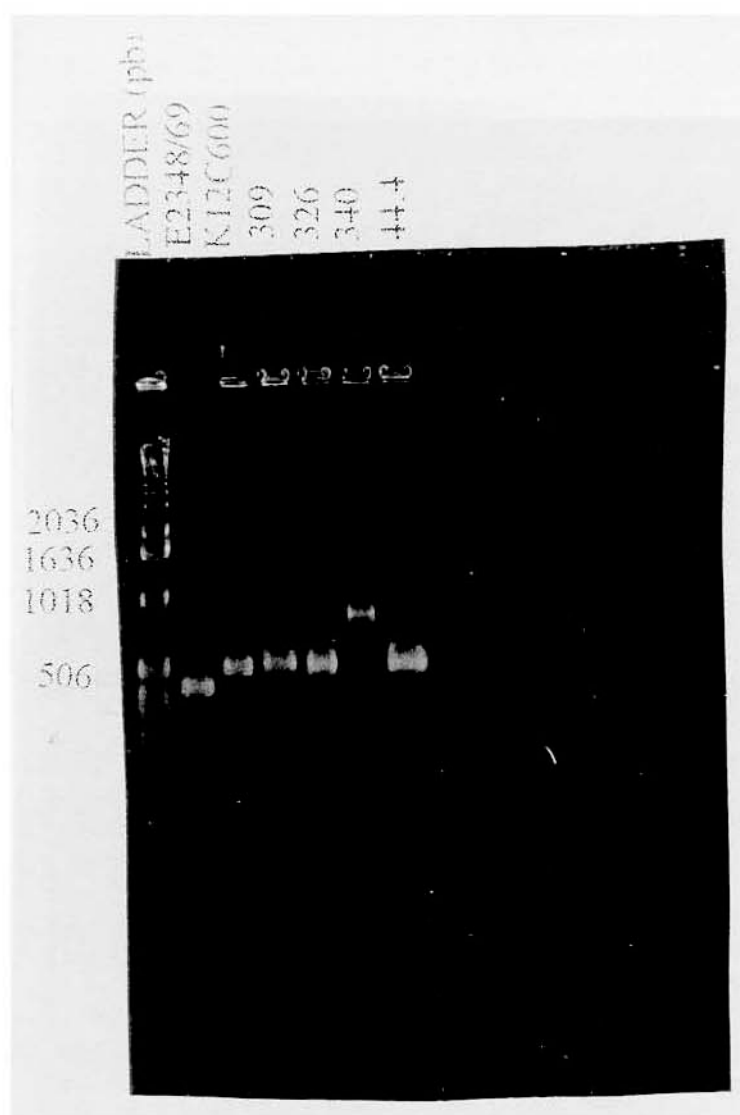


Figura 12. Resultado do teste de PCR para determinar o local de inserção de LEE, nas amostras 309, 326, 340 e 44.4.

X. Discussão

Escherichia coli enterotoxigênicas podem provocar colibacilose em bezerros, afetando principalmente animais recém-nascidos e pós desmamados (ACRES, 1985). Sua patogenicidade é devida a produção de enterotoxinas e a expressão de adesinas. Os dois fatores são geralmente codificados por plasmídios.

Amostras ETEC bovinas são capazes de produzir LT-II com grande frequência no exterior, principalmente na Ásia e também STa (BLANCO et al., 1992).

Neste trabalho, nos dois testes para detecção da enterotoxina LT-I (Imuno Hemólise Radial e Imuno Hemólise Radial Modificado), observou-se que não houve a formação de halo de hemólise em nenhum dos testes indicando a não produção dessa enterotoxina nas amostras testadas, o que foi confirmado pelo teste de PCR, onde não houve amplificação dos genes utilizados para detecção desta toxina.

Na pesquisa da enterotoxina LT-II através de PCR, detectou-se a presença desta enterotoxina, em apenas uma amostra (280).

Tanto quanto sabemos esta é a primeira detecção de LT-II em amostras de *E. coli* isoladas de fezes diarréicas de bezerro, no Brasil. Outros estudos no nosso país detectaram esta enterotoxina em amostras de carne do tipo hamburger (GUTH et al., 1986).

No teste de Dean (DEAN et al., 1973) para detecção da enterotoxina STa, observou-se que não houve a produção desta toxina em nenhuma das 52 amostras testadas sendo que estas apresentaram resultado muito abaixo de 0,085 na relação

peso do intestino/peso da carcaça, o que foi confirmado com o teste de PCR para a detecção de STa.

Todos os testes de PCR também mostraram resultados negativos para as toxinas STb, CNF1 e CNF2, indicando que as amostras testadas não fazem parte do grupo das *E. coli* enterotoxigênicas, nem das *E. coli* necrotizantes. Estes resultados diferem dos resultados dos trabalhos de BLANCO et al. (1988) e de BURNS et al. (1996), onde eles encontram amostras de *E. coli* produtoras de CNF1 ou CNF2 em amostras de fezes de bezerros com diarreia e de bezerros normais, sendo que a porcentagem de NTEC isoladas de bezerros normais é maior.

Apesar de amostras STEC formarem parte da flora normal de gado bovino, em determinadas circunstâncias podem comportar-se como enteropatógenos e provocar diarreia em bezerros (BLANCO et al., 1992; BLANCO et al, 1994; BURNENS et al., 1995, YANO et al., 1986). Elas podem produzir Stx1 e Stx2. DORN et al. (1993) sugerem que as *E. coli* produtoras de Stx1 são mais comuns em bezerros e infecções por *E. coli* produtoras de Stx2 são mais comuns no gado mais adulto.

Algumas STEC bovinas tem características similares a EHEC, de importância na patologia humana, produzindo quantidades elevadas de Stxs, estando associadas com colite hemorrágica, seguido de síndrome urêmica, com letalidade considerável (DORN et al., 1993; DEAN-NYSTRON et al., 1997).

Muitas amostras STEC isoladas de gado com diarreia revelaram “in vitro” as lesões características descritas como lesões “attaching and effacing” (HALL et al., 1985; MOXLEY & FRANCIS, 1986). Esse fato pode aumentar a virulência dessas amostras STEC (BLANCO et al., 1996).

Embora amostras STEC tenham sido isoladas com alta proporção de bezerros diarreicos e sadios (MOHAMMAD et al., 1985; MOHAMMAD et al., 1993; MAINIL et al., 1987; BLANCO et al., 1988; BLANCO et al., 1993), estudos re-

centes sugerem que amostras que produzem Stx1 somente e possuem o gene *eae* necessário para causar as lesões A/E podem estar envolvidos na diarreia de bezerros (WIELER et al., 1992; DORN et al., 1993; MAINIL et al., 1993; BLANCO et al, 1996).

Amostras de bezerros produtoras de Stx1 abrigam o LEE significativamente mais que as produtoras de Stx2 (WIELER et al., 1996; WIELER et al., 1998).

DEAN-NYSTRON et al. (1998), demonstraram que o gene *eae* é necessário para amostras *E. coli* O157:H7 colonizar intensivamente o intestino e causar lesões A/E em bezerros neonatais. Mostraram também que a aderência mediada por *eae* à mucosa intestinal é crítica para EHEC causar enterocolite fibrinohemorrágica e diarreia em bezerros.

Nossos resultados não apontaram a presença de nenhuma das Shiga-toxins (Stx1 e Stx2) em nossas amostras, não amplificando com os iniciadores por nós utilizados nos testes de PCR.

Ao contrário do que pode parecer, os resultados negativos para as enterotoxinas (LT-I, LT-II, STa e STb) e citotoxinas (Stxs e CNFs) nas amostras era um de nossos objetivos, pois queríamos examinar *E. coli* isoladas de bovinos com diarreia que não fossem enterotoxigênicas nem citotoxigênicas, com o intuito de podermos relacionar estas amostras com a presença do gene *eae*.

Os resultados obtidos com o teste de aderência às células HEp-2 não se repetiram para algumas amostras, no teste de aderência em células HeLa . Observamos uma grande porcentagem (51,61% em células HEp-2 e 72,41% em células HeLa) de amostras que apresentaram “Aderência não Característica” quando incubadas a 37°C por 3 horas, tanto em células HEp-2 como em células HeLa, o que não se repetiu com as células HEp-2 quando o teste foi feito incubando-se por 6 horas as placas, pois esta porcentagem diminuiu para 20%. Observamos também uma grande fre-

quência de amostras com aderência do tipo “Agregativa”, quando incubadas por 6 horas em células HEp-2 (50%). A amostra 309 apresentou aderência difusa apenas no teste com 6 horas. A amostra 44.4 foi testada em HEp-2 , apresentando resultado positivo para aderência localizada-like. Este teste foi realizado como etapa preliminar para o teste de FAS. Estes resultados nos incentivaram na busca de possíveis novas adesinas que estas amostras poderiam apresentar.

O teste de Microhemaglutinação Manose-Resistente, utilizado como presuntivo para a presença de adesinas principalmente fimbriais, não apresentou resultados significativos, sendo que apenas algumas amostras apresentaram aglutinação com hemácias humanas, porém em baixos títulos.

Lesões caracterizadas por bactérias intimamente ligadas a células epiteliais com destruição das microvilosidades foram detectadas histologicamente e confirmadas ultraestruturalmente nos intestinos grosso e delgado de bovinos (POSPISCHIL et al., 1987, HALL et al., 1985, MAINIL et al., 1987).

O estudo desse tipo de lesão, chamado de “attaching and effacing” aumentou muito nesta década, usando-se modelos animais, culturas celulares e testes mais sofisticados diretos ou indiretos, como o FAS, Microscopia Eletrônica de Transmissão e Western Blot, além de testes genéticos, como é o caso do PCR (GANNON et al., 1995; ADU-BOBIE et al., 1998; SHARIFF et al., 1993).

Nenhuma das amostras testadas possuía o gene que codifica para “Bundle Forming Pilus”. Sendo ainda considerado de grande importância no estágio inicial da formação das lesões do tipo A/E (GIRÓN et al., 1991), a sua ausência em nossas amostras pode ser explicada em um trabalho de KNUTTON et al. (1987), onde se demonstrou que uma amostra EPEC que perdeu espontaneamente o plasmídio EAF, e portanto é deficiente na expressão de BFP, ainda era capaz de aderir-se a culturas de mucosa intestinal de adultos em pequenas microcolônias e formar lesões do tipo

A/E, sugerindo que o plasmídio não é requerido para estágios posteriores da formação das mesmas (HICKS et al., 1998).

De todas as amostras que testamos, selecionamos 4 (amostras 309, 326, 340 e 44.4), de maior interesse, as quais continham o gene *eae*, comprovado pelo teste de PCR. Estas amostras foram estudadas mais detalhadamente, sendo que, por conterem este gene, poderiam ser responsáveis pelo “attaching and effacing”.

Dessas amostras, somente a 309 e a 44.4 tiveram resultado positivo no teste de aderência, apresentando aderência difusa e localizada-like, respectivamente. Este fato nos proporcionou realizar o teste de FAS, o qual apresentou-se positivo para as duas amostras, sendo esta mais uma evidência na formação das lesões que procurávamos, pois com este teste podemos observar a polimerização da actina celular nos locais onde a bactéria se aderiu (KNUTTON et al., 1989).

Realizamos então o teste de Western Blot para detecção de intimina. Esta proteína é encontrada nas amostras *eae* positivas, sendo codificada por este gene. O resultado de sua expressão é a ligação da bactéria à célula e acúmulo de actina polimerizada em pedestais onde a bactéria se aderiu (GIRÓN et al., 1991).

O resultado do Western Blot foi o esperado, sendo que confirmamos a presença da intimina nas 4 amostras testadas para a produção desta proteína de 94kDa.

Tendo como base as pesquisas de ADU-BOBIE et al. (1998), no qual descrevem-se os subtipos de intimina, a saber, α , β , γ e δ , baseado nos domínios de ligação à célula, realizamos testes de PCR para descobrirmos qual o subtipo de intimina que nossas amostras apresentavam, utilizando os iniciadores sugeridos neste trabalho.

Demonstrou-se que as amostras 326, 340 e 44.4 amplificavam com os iniciadores para a intimina β , sendo que a amostra 309 não amplificou com nenhum dos iniciadores por nós utilizados. Este resultado se repetiu quando realizamos um

Western Blot utilizando um soro anti-intimina β específico, o qual nos foi cedido gentilmente pelo Prof. Gad Frankel (Department of Biochemistry – Imperial College of Science – Technology and Medicine – London – UK). As 3 amostras positivas para intimina β pelo resultado do teste de PCR também apresentaram uma banda de 94 kDa quando o teste de Western Blot foi revelado, representando a ligação do anti-soro à intimina β . Porém, nenhuma banda foi observada na amostra 309. Esta, provavelmente esteja incluída entre as amostras não tipáveis, mencionadas no trabalho de ADU-BOBIE et al. (1998).

Nossas amostras positivas para *eae* foram sorotipadas e os resultados foram os seguintes: a amostra 309 pertence ao sorotipo O103:H2, a amostra 340, ao sorotipo O123:H11, a amostra 44.4 ao sorotipo O26:H⁻, e a amostra 326 não reagiu com nenhum dos soros testados para o antígeno O, mas apresentou-se positiva para o antígeno H11. Esses dados demonstram claramente que nenhuma de nossas amostras positivas para *eae* fazem parte de sorotipos EPEC e A-EPEC conhecidos.

O passo seguinte na realização do nosso trabalho, foi investigarmos onde estava inserido o LEE nas amostras onde encontramos o *eae* e as intiminas. A região LEE, como já descrito anteriormente, contém todos os genes necessários para o fenótipo A/E.

Em EPEC E2348/69 (O127:H6) e STEC (O157:H7) o LEE está inserido a 82 minutos no cromossomo de *E. coli*, a-ajusante (downstream) do gene que codifica o RNAt para selenocisteína (*selC*). Em STEC do sorotipo O26:H⁻, o LEE está inserido a 94 minutos no gene que codifica o RNAt para fenilalanina (*pheU*) (SPERANDIO et al., 1998).

Realizamos testes de PCR com os iniciadores indicados na publicação de SPERANDIO et al. (1998), sendo que o conjunto K255 e K260 amplificam a junção direita do LEE com o gene *selC*. O conjunto K295 e K296 amplificam a junção

esquerda do LEE com o gene *selC* e o conjunto K260 e K261 amplificam o gene *selC* intacto, ou seja, sem o LEE inserido. O conjunto K913 e K914 amplificam o gene *pheU* intacto. O conjunto K723 e K724 amplificam a junção direita do LEE com o gene *pheU* e o conjunto K721 e K722 amplificam a junção esquerda do LEE com o gene *pheU* (Esquema da página 58).

Três de nossas amostras amplificaram com o conjunto K260 e K261, formando uma banda de aproximadamente 527 pb, indicando o *selC* intacto. A saber, amostras 309, 326 e 44.4. A amostra 340, neste mesmo teste amplificou uma banda de aproximadamente 860 pb.

A amostra 309 amplificou o gene *pheU* intacto, indicando que nesta amostra o LEE não está inserido em *pheU*. As amostras 326 e 44.4 amplificaram uma banda que migra com menor velocidade que a banda da amostra negativa e a amostra 340 amplificou duas bandas. Essas bandas de tamanhos diferentes podem ser devido a amplificação de *selC* ou *pheU*, juntamente com outro gene, ou outra região, o que resultaria em uma amplificação de maior número de pares de bases. Estes dados estão de acordo com o trabalho de GOFFAUX et al. (1997), onde amostras bovinas testadas para inserção de LEE amplificaram cerca de 850 pb com os iniciadores K260 e K261.

Nenhuma das amostras amplificou com os conjuntos K255-K260 e K295-K296, indicando claramente que o LEE não está inserido dentro do gene que codifica o RNAt de selenocisteína.

O isolamento de amostras possuindo o gene *eae* entre bezerros com diarreia tem ocorrido em vários países. Porém, na maioria dos casos ocorre uma associação com a produção de SLT-I e/ou SLT-II (BLANCO et al., 1996). No Brasil, SARIDAKIS et al. (1997) reportaram uma alta frequência de amostras *eae* positivas pertencentes a sorogrupos EPEC e há uma alta frequência da aderência do tipo

localizada (AL) entre essas amostras. Em nossas pesquisas, não encontramos nenhuma amostra *eae* positiva com o padrão AL, e nenhuma pertenceu aos sorotipos conhecidos de EPEC.

Concluindo, os resultados obtidos neste trabalho nos permitiram demonstrar os seguintes dados mais relevantes, em nossa opinião: 1º - em nossas não houve estreita correlação no padrão de aderência entre as 2 linhagens celulares testadas, e também não foi encontrado o padrão de aderência localizada entre as amostras *eae* positivas, diferentemente do que ocorre em amostras EPEC, de origem humana; 2º - esta é a primeira constatação de intiminas do subtipo β em amostras bovinas, que se enquadravam em grupos não encontrados em humanos, pelo menos no que tange as EPEC e EPEC-A e 3º - em nossas amostras não encontramos o LEE inserido no gene *selC* e nem no gene *pheU*, porém a detecção do *eae* e de intiminas em nossas amostras vem comprovar a presença do LEE, que provavelmente deve estar inserido em outro gene que não *SelC* e *pheU*, necessitando e até mesmo abrindo caminhos para novas pesquisas básicas e aplicadas na patogenicidade de *Escherichia coli* de origem animal e humana.

XI. Conclusões

Os resultados obtidos no estudo das 52 amostras de *E. coli* por nós estudadas permitiu-nos apresentar as seguintes conclusões principais:

1. Os testes de PCR para o gene *eae* revelaram 4 amostras positivas para este gene (amostras 309, 326, 340 e 44.4).
2. Não houve total correlação entre padrão de adesão em células HeLa e HEp-2, nas amostras positivas para este teste.
3. Vários padrões de adesão foram observados entre as amostras estudadas (AD, AA, “cover slip” e não-característica).
4. O padrão de Adesão Localizada (AL) não foi encontrado nas 4 amostras *eae* positivas.
5. A prova de hemaglutinação manose-resistente feita com diversas hemácias não apresentou resultados significativos.
6. Os testes de PCR para determinar os subtipos de intimina revelaram a presença de três amostras produtoras de intimina β (amostras 326, 340 e 44.4) e uma amostra (amostra 309) não amplificou com nenhum dos iniciadores conhecidos, indicando que esta é produtora de uma intimina ainda não tipada.
7. Os resultados de PCR para detecção de intimina geral e intimina β foram confirmados com testes de Western blot com os anti-soros específicos para cada tipo.

8. O teste de F A S das amostras 309 e 44.4 revelaram a presença de lesões do tipo A/E quando as mesmas foram ensaiadas com células da linhagem HEp-2.
9. As amostras 326 e 340 não apresentaram adesão as linhagens celulares testadas, fato este que tornou inviável a verificação “in vitro” das lesões tipo A/E com estas amostras.
10. Dentre as amostras que se apresentaram positivas para o gene *eae* (amostras 309, 326, 340 e 44.4), não houve correlação entre os sorogrupos EPEC e EPEC-A conhecidos.
11. Os testes de PCR para determinar o local de inserção de LEE nos levaram a conclusão de que, em nossas amostras positivas para *eae* o LEE não está inserido dentro dos genes *selC*, como ocorre na amostra E2348/69 e nem em *pheU* , como ocorre na amostra O111ac:H⁻.

XII. Apêndice

1. MEIOS DE CULTURA

1.1. Meio TSB (Trypticase Soy Broth)

O meio TSB (DIFCO) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante.

1.2.Meio BHI (Infusão de Cérebro e Coração)

O meio BHI (DIFCO) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante.

1.3. Meio EPM

a) Meio Base

Triptona	10g
Extrato de Carne	2g
NaCl	5g
Na ₂ HPO ₄ .5H ₂ O	2g
Sol. alc. azul de bromotimol (1,5%)	2ml
Ágar	11g
Água destilada	1000ml

b) Solução de Sais

Citrato de ferro amoniacal	2g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2g
Glicose	10g
Uréia	40g
Água destilada	85ml

A solução de sais foi esterilizada a 65°C, em Banho-Maria, por 1 hora e adicionada na quantidade de 17,5ml para cada litro de Meio Base, o qual teve seu pH ajustado para 7,4.

1.4. Meio MILi (pH6.5)

Extrato de levedura	3g
Peptona	10g
Triptona	10g
L-lisina	10g
Dextrose	1g
Ágar	2g
Bromocresol púrpura	0,02g
Água destilada	1000ml

1.5. Meio Ágar Citrato de Simmons

O meio Ágar Citrato de Simmons (DIFCO) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante.

1.6. Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado (MEM)

O meio MEM (CULTILAB) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante.

1.7. Meio de Minca

a) Meio base

KH_2PO_4	1.36g
Extrato de levedura	1,50g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10,10g
Glicose	1,00g
Ágar	20,0g
Casaminoácidos	1,00g
Água destilada	1000ml

b) Solução de Sais

MgSO ₄ .7H ₂ O	10,000g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,000g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,135g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,400g
Água Milli-Q estéril	1000ml

Foi Adicionado 1ml da solução de sais para cada 1000ml do meio base

1.8. Meio Mínimo

Solução de Sais

K ₂ HP0 ₄	140g
KH ₂ PO ₄	60g
Citrato de Sódio	10g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	20g
Água destilada	1000ml

Em 200ml de ágar a 2%, foi acrescentado 10ml da solução de sais e glicose para concentração final de 0,5%.

1.9. Meio CFA

a) Meio Base

Casaminoácidos	10g
Extrato de levedura	1,5g
Ágar	20g
Água destilada	1000ml
Solução de Sais	10ml

b) Solução de Sais

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1g/100ml
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,78g/100ml

Para compor 10ml solução de sais, foram misturados 5ml da solução de cada sal.

1.10. Meio TSA (Tryptic Soy Agar)

O meio TSA (DIFCO) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante.

1.11. Meio CAYE

a) Solução de Sais

MgSO ₄	5%
MnCl ₂	0,5%
FeCl ₃	0,5%

Dissolver em 100ml de H₂SO₄ (0,001M) e esterilizar por filtração.

b) Meio Base

Extrato de levedura	6g
Casaminoácidos	20g
NaCl	2,5g
K ₂ HPO ₄	8,75g

Dissolver os reagentes em 1000 ml de H₂O destilada e autoclavar a 121°C por 20 minutos. Depois de estéril, adicionar 1 ml da solução de sais para cada 1000 ml de meio básico.

1.12. Lúria ágar

Triptona	10g
Extrato de levedura	5g
NaCl	5g
Ágar bacteriológico	15g
Água destilada	1000ml

1.13. Meio de Dorset

4 volumes de ovo

1 volume de salina estéril

Foi misturado o ovo a salina, filtrado em gase estéril, distribuído em tubos e esterilizado em banho de areia.

2. SOLUÇÕES

2.1. Tampão Salina Fosfatada (PBS) 0,1M

NaCl	80,0g
KCl	2,0g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	28,9g
KH ₂ PO ₄	2,0g
Água Milli-Q	1000ml

Os sais foram diluídos em 10% a menos do volume, com exceção do KH₂PO₄, o qual foi misturado ao volume restante e utilizado no ajuste do pH para 7,4. (Solução de uso : 0,01M).

2.2. Solução de ATV (Associação de Tripsina-Versene)

a) Salina

NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	2,9g
KH ₂ HPO ₄	0,2g
Água Milli-Q	1000ml

Autoclavado e armazenado à 4°C.

b) Tripsina

Tripsina (DIFCO)	2,0g
Solução salina (a)	10ml

c) Solução de Versene

Versene (EDTA)	0,2g
Solução salina (a)	10ml

d) Solução Vermelho de Fenol

Vermelho de Fenol	0,5g
NaOH 1N	3,5ml

e) Solução Final

Solução de tripsina (b)	50,0ml
Solução de versene (c)	10,0ml
Solução de Vermelho de fenol (d)	1,5ml

Ajustada para o pH 7,5.

Esterilizada por filtração.

2.3. Tampão Fosfato de Sódio (pH6,8)

Solução de Na_2HPO_4 0,002M em água destilada.

2.4. Tampão Tris-Borato (TBE)

Tris base	54g
Ácido bórico	27,5g
0,5M EDTA (pH8,0)	20ml
Água destilada	1000ml

2.5. Tampão de Amostra

SDS	4%
Tampão Tris-HCl 0,5M pH6,8	200mM
Azul de Bromofenol	0,001%
2-Mercaptoetanol	5%
Água Destilada	

2.6. Gel de Poliacrilamida 8%

H ₂ O Mili-Q	12,56ml
Tampão Tris 1,5M pH8,8	7,00ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	7,44ml
SDS 10%	280μl
TEMED	20μl
Persulfato de Amônio 10%	200μl

2.7. Gel de Empacotamento

H ₂ O Mili-Q	3,34ml
Tampão Tris 1,5M pH6,8	2,50ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30%.	0,75ml
SDS 10%	50µl
TEMED	15µl
Persulfato de Amônio 10%	15µl

2.8. Tampão de Corrida (10x)

Tris Base	6,06g
Glicina	28,82g
SDS	1,00g
H ₂ O destilada	100ml

2.9. Tampão de Transferência

Glicina	2,93g
Tris Base	5,81g
SDS	0,375g
Metanol	200ml
H ₂ O destilada	1000ml

2.10. Solução de Ponceau S (corante reversível)

Ponceau S	0,5%
Ácido acético glacial	1ml
H ₂ O destilada	100ml

2.11. Solução Bloqueadora

Triton	0,1%
Leite MOLICO	4%
PBS 0,05M pH7,4	

2.12. Tampão Trietanolamina 10X

MgSO ₄ .7H ₂ O	1,23g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2g
NaCl	75,0g
Trietanolamina	34,70g
Água destilada	1000ml

Dissolver os reagentes em 10% a menos do volume final. Acertar pH para 7,4 com HCl. Completar o volume para 1000 ml. Conservar em Freezer. Para uso, diluir 10X acrescentando 0,5% de gelatina.

2.13. Formalina

PBS	100ml
-----	-------

Formaldeído a 37%	8ml
-------------------	-----

XIII. Referências

ABE, A.; KENNY, B.; STEIN, M.; FINLAY, B.B. Characterization of two virulence proteins secreted by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*, EspA and EspB, whose maximal expression is sensitive to host body temperature. *Infect. Immun.*, 65: 3547-3555, 1997.

ACRES, S.D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. *J. Dairy Sci.*, 68 (1): 229-256, 1985.

ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C.; GONÇALVES, A. G.; TRABULSI, L. R.; DOUCE, G.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G. Detection of intimins α , β , γ , and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, 36(3): 662-668, 1998.

ADU-BOBIE, J.; TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin α and intimin β from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 66: 5643-5649, 1998.

AGIN, T.S.; CANTEY, J.R.; BOEDEKER, E.C; WOLF, M.K. Characterization of the *eaeA* gene from rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* strain RDEC-1 and comparison to other *eaeA* genes from bacteria that cause attaching-effacing lesions. FEMS Microbiol. Letters, 144: 249-258, 1996

AGIN, T.S.; WOLF, M.K. Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing Attaching-Effacing lesions in rabbits, humans, and swine. Infect. Immun., 65: 320-326, 1997.

ALBERT, M.J.; ALAM, K.; ANSARUZZAMAN, M.; MONTANARO, J.; ISLAM, M.; FARUQUE, S.M.; HAIDER, K.; BETTELHEIM, K., TZIPORI, S. Localized adherence and attaching-effacing properties of nonenteropathogenic serotypes of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 59: 1864-1868, 1991.

ALONSO, M.P.; BLANCO, J.E.; GONZÁLEZ, E.A.; GARABAL, J.I. Characteristics of haemolytic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF 1). Res. Microbiol., 143:869-878, 1992.

ALONSO, P.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; GONZÁLEZ, E.A. Frequent production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from human urinary tract infections: relation with haemagglutination. FEMS Microbiol. Lett., 48:391-396, 1987.

ALVAREZ, M. B. *Escherichia coli* enterotoxigênicos, necrotizantes y verotoxigênicos de origem humano e bovino. Tesis Doctoral. Depto. de Microbiología e Parasitología, Universidade de Santiago de Compostela, 1991.

BEGUM, D.; STROCKBINE, A.; SOWERS, E.G. & JACKSON, M.P. Evaluation of a technique for identification of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled probes. J. Clin. Microbiol. 31: 3153-3156, 1993.

BETTEY, M.J.; MILLER, V.L.; MEKALANOS, J.J. Genetics of bacterial enterotoxins. Annual Rev. of Microbiol., 40: 577-605, 1986.

BLANCO, J.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; BLANCO, J.E.; GARABAL, J.I.; GONZÁLEZ, E.A. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 e CNF2. FEMS Microbiol. Letters, 96: 155-160, 1992.

BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; ESCRIBANO, A. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por *Escherichia coli* enterohemorrágicos productores de verotoxinas. Enferm. Infect. Microbiol. Clin., 11(6): 324-334, 1993.

BLANCO, J.; BLANCO, M.; GARABAL, J.I., GONZÁLEZ, E.A. Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals. Microbiologia SEM, 7: 57-72, 1991.

BLANCO, J.; GONZÁLEZ, E.A.; GARCÍA, S.; BLANCO, M.; REGUEIRO, B.; BERNÁZDEZ, I. Production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (North-western Spain). Vet. Microbiol., 18:297-311, 1988.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J.E.; RAMOS, J. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. Am. J. Vet. Res., 54:1446-1451, 1993.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; GONZÁLEZ, E.A.; MORA, A.; PRADO, C.; FERNANDEZ, L.; RIO, M.; RAMOS, J.; ALONSO, M.P. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *Escherichia coli* in healthy cattle. Epidemiol. Infect., 117:251-257, 1996.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; GONZÁLEZ, E.A.; GARABAL, J.I.; BLANCO, J.E. *Escherichia coli* toxigénicos de origen bovino. Med. Vet. 9: 199-213, 1992.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; VERBRUGGEN, A.; JANSEN, W.H. Serotypes of bovine *Escherichia coli* producing cytotoxic necrotizing factor type 2 (CNF 2). Vet. Microbiol., 39: 83-88, 1994.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J.E.; GONZÁLEZ, E. A.; GOMES, T.A.T.; ZERBINI, L.F.; YANO, T.; CASTRO, A.F.P. Genes coding for Shiga-like toxins in bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) strains belonging to different O:K:H serotypes. Vet. Microbiol., 42: 105-110, 1994.

BURNENS, A.P.; FREY, A.; LIOR, H.; NICOLET, J. Prevalence and clinical significance of Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from cattle in herds with and without calf diarrhea. J.Vet. Med., 42: 311-318, 1995.

BUNS, A.L.; BALL, H.J.; FINLAY, D.A. CNF producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Northern Ireland. Vet. Microbiol., 49:235-241, 1996.

CANTEY, J.R.; MOSELEY, S.L. HeLa cell adherence, actin aggregation, and invasion by nonenteropathogenic *Escherichia coli* possessing the *eae* gene. Infect. Immun., 59: 3924-3929, 1991.

CAPRIOLI, A.; FALBO, V.; RODA, L.G.; RUGGERI, F.M.; ZONA, C. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morfological cell alterations. Infect. Immun., 39: 1300-1306, 1983.

CASTRO, A. F. P.; YANO, T. Diarréia de Bezerros. EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa. Gado de Leite. Coronel Pacheco, MS, 2-8, 1992.

CHINA, B.; PIRSON, V.; JACQUEMIN, E.; POHL, P.; MAINIL, J.G. Pathotypes of bovine verotoxigenic *Escherichia coli* isolates producing attaching/effacing (A/E) lesions in the ligated intestinal loop assay in rabbits. Adv. Exp. Med. Biol., 412: 311-316, 1997.

DANBARA, H.; KOMASE, K.; ARITA, H.; ABE, H.; YOSHIKAWA, M. Molecular analysis of enterotoxins plasmids of enterotoxigenic *E. coli* of 14 different O serotypes. Infect. Immun., 56:1513-1517, 1988.

DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIAMS, R.G.; HARDEN, L.B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125: 407-411, 1973.

DEAN-NYSTRON, E.A.; BOSWORTH, B.T.; CRAY, W.C.JR.; MOON, H.W. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect. Immun.*, 65: 1842-1848, 1997.

DEAN-NYSTROM, E.A.; BOSWORTH, B.T.; MOON, H.W.; O'BRIEN, A.D. *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenic in calves. *Infect. Immun.*, 66: 4560-4563, 1998.

DE AVILA, F.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; LALLIER, R.; FAIRBHOTHER, J.M.; MAINIL, J. A new fimbrial antigen on *Escherichia coli* strains isolated from zebu (*Bos indicus*) calves with diarrhoea in Brazil. *Vet. Rec.*, 123:80-81, 1998.

DONNENBERG, M.S.; YU, J.; KAPER, J.B. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of Enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J. Bacteriol.*, 175 (15): 4670-4680, 1993.

DORN, C.R.; FRANCIS, D.H.; ANGRICK, E.J.; WILLGOHS, J.A.; WILSON, R.A.; COLLINS, J.E.; JENKE, B.H.; SHAWD, S.J. Characteristics of verocytotoxin producing *Escherichia coli* associated with intestinal colonization and diarrhea in calves. *Vet. Microbiol.*, 36: 149-159, 1993.

DYTOC, M.; SONI, R.; COCKERILL, F. Multiple determinants of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 attachment- effacement. *Infect. Immun.*, 61: 3382-3391, 1993.

EWING, W.H. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. New York. Elsevier Science Publishing Co., 1986.

FAIRBROTHER, J.M.; LARIVIÈRE, S.; LALLIER, R. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. Infect. Immun., 54: 10-15, 1986.

FALBO, V.; FAMIGLIATTI, M.; CAPRIOLI, A. Gene block encoding production of cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin in *Escherichia coli* isolates from extraintestinal infections. Infect. Immun., 60:2182-2187, 1992.

FISCHER, J.; MADDOX, C.; MOXLEY, R.; KINDEN, D.; MILLER, M. Pathogenicity of a bovine attaching-effacing *Escherichia coli* isolate lacking Shiga-like toxins. Am. J. Vet. Res., 55: 991-999, 1994.

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

GANNON, V.P.J., RASHED, M., KING, R.K., GOLSTEYN THOMAS, E.J. Detection and characterization of *eae* gene of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 31:1268-1274, 1993.

GATTI, M.S.V.; SERAFIM, M.B.; CASTRO, A.F.P. Fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas para suínos no Brasil. Rev. Microbiol.; 16: 21-30. 1985.

GILL, D.M.; RICHARDSON, S.H. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalysed by heat-labile enterotoxin of *E. coli* : comparison with cholera toxin. J. Infec. Dis., 141: 64-70, 1980.

GIRARDEAU, J.P.; VARTANIAN, M.; OLLIER, J.L.; CONTREPOIS, M. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen of bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. Infect. Immun., 56: 2180-2188, 1988.

GIRÓN, J.A.; DONNENBERG, M.S.; MARTIN, W.C.; JARVIS, K.G.; KAPER, J.B. Distribution of the Bundle-Forming Pilus structural gene (*bfpA*) among Enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Infec. Dis., 168: 1037-1041, 1993.

GIRÓN, J.A.; HO, A.S.; SCHOOLNIK, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. Science, 254: 710-713, 1991.

GOFFAUX, F.; MAINIL, J.; PIRSON, V.; CHARLIER, G.; POHL, P.; JACQUEMIN, E.; CHINA, B. Bovine attaching and effacing *Escherichia coli* possesses a pathogenesis island related to the LEE of the human enteropathogenic *Escherichia coli* strain E2348/69. FEMS Microbiol. Letters, 154: 415-421, 1997.

GONZÁLEZ, E.A.; BLANCO, J. Serotypes and antibiotic resistance of verotoxigenic (VTEC) and necrotizing (NTEC) *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhoea. FEMS Microbiol. Letters, 60:31-36, 1989.

GUINÉE, P.A.M.; ACTERBERG, C.M. & JANSEN, W.H. *Escherichia coli* O antigen typing by means of a mechanized microtechnique. Appl. Microbiol., 24: 127-131, 1972.

GUTH, B.E.C.; TWIDDY, E.M.; TRABULSI, L.R.; HOLMES, R.K. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 54: 529-536, 1986.

HALL, G.A.; REYNOLDS, D.J.; CHANTER, N.; MORGAN, J.H.; PARSONS, K.R.; DEBNEY, T.G.; BLAND, A.P.; BRIDGER, J.C. Dysentery caused by *Escherichia coli* (S102-9) in calves: natural and experimental disease. Vet. Pathol., 22:156-163, 1985.

HAREL, J.; FAIRBROTHER, J.; FORGET, C.; DE SAUTELS, C.; MOORE, J. Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves. Vet. Microbiol., 38: 139-155, 1993.

HELIE, P.; MORIN, M.; JACQUES, M.; FAIRBROTHER, J.M. Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45:K⁺E65⁺ strain. Infect. Immun., 59:814-821, 1991.

HICKS, S.; FRANKEL, G.; KAPER, J.B.; DOUGAN, G.; PHILLIPS, A.D. Role of intimin and bundle-forming pili in Enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect. Immun.*, 66:1570-1578, 1998.

HOLMES, R.K.; TWIDDY, E.M.; PIKETT, C.L. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* *Infect. Immun.*, 53:464-477, 1986.

IMBERECHTS, H.; BERTSCHINGER, H.U.; STAMM, M.; SYDLER, T.; POHL, P.; DE GREVE, H.; HERNALSTEENS, J.P.; VAN MONTAGU, M.; LINTERMANS, P. Prevalence of F107 fimbriae on *Escherichia coli* isolated from pigs with oedema disease or postweaning diarrhoea. *Vet. Microbiol.*, 40: 219-230, 1994.

JACKSON, M.P. Structure-function analyses of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Microbiol. Pathogenesis*, 8:235-242, 1990;

JARVIS, K.G.; KAPER, J.B. Secretion of extracellular proteins by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect. Immun.*, 64: 4826-4829, 1996.

JERSE, A.E.; GICQUELAIS, K.G.; KAPER, J.B. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 59:3869-3875, 1991.

JERSE, A.E.; KAPER, J.B. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect. Immun.*, 59: 4302-4309, 1991.

JONES, G.W. & RUTTER, J.M. The association of K88 antigen with haemagglutination activity of porcine strains of *Escherichia coli* of the O141 serotype. *J.Clin. Microbiol.*, 28:2006-2011, 1990.

KAPER, J.B. Defining EPEC. *Rev. Microbiol.*, 27:130-133, 1996.

KNUTTON, S.; ADU-BOBIE, J.; BAIN, C.; PHILLIPS, A.D.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect. Immun.*, 65:1644-1652, 1997.

KNUTTON, S.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.K.; McNEISH, A.S. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect. Immun.*, 55:78-85, 1987.

KNUTTON, S.; BALDWIN, T.; WILLIAMS, P.H.; MCNEISH, A.S. Actin accumulation at sites of adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 57: 1290-1298, 1989.

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

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 18: 775-779, 1977.

LAI, L.C.; WAINWRIGHT, L.A.; STONE, K.D.; DONNENBERG, M.S. A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infect. Immun.*, 65: 2211-2217, 1997.

LAW, D. Adhesion and its role in the virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiol. Reviews*, 7 (2): 152-173, 1994.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea enterotoxigenic, enteropathogenic, enterinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.*, 155:377-389, 1987.

LINTERMANS, P.F.; BERTELS, A.; CHARLIER, G.; DAMME, J.; SCHOUPE, J.; SHLICKER, C.; KORHOMEN, T.; GREVE, H.; VAN MONTAGU, M. Characterization and purification of the F17 adhesin of the surface of bovine enteropathogenic and septicemic *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.*, 49: 1794-1799, 1988.

LINTERMANS, P.; POHL, P.; DEBOECK, F.; BERTELS, A.; SCHLICKER, C.; VAN DE KERCKHONE, J.; VAN DAMME, J.; VAN MONTAGU, M.; GREVE, H. Isolation and nucleotide sequence of the F17-A gene encoding the structural protein of the F17 fimbriae in bovine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 56: 1475-1484, 1988.

MAC LEOD, D.L.; GYLES, C.L. Purification and characterization of an *E. coli* Shiga-like toxin II variant. *Infect. Immun.* 58: 1232-1239, 1990.

MAINIL, J.; DUCHESNES, C.J.; WHIPP, S.C.; MARQUES, L.R.M.; O'BRIEN, A.D.; CASEY, T.A.; MOON, H.W. Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *Am. J. Vet. Res.*, 48 (5): 743-748, 1987.

MAINIL, J.G.; JACQUEMIN, E.R.; KAECKENBEECK, A.E.; POHL, P.H. Association between the effacing (*eae*) gene and the Shiga-like toxin-encoding genes in *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 54 (7), 1993.

MAZOUARI, K.; OSWALD, E.; HERNALSTEENS, J.P.; LINTERMANS, P.; GREVE, H. F17-Like frimbriae from a invasive *Escherichia coli* strain producing Cytotoxic Necrotizing Factor Type 2 Toxin. *Infect. Immun.*, 62: 2633-2638, 1994.

McDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K 12. *Molec. Microbiol.*, 23(2), 399-407, 1997.

McDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92:1664-1668, 1995.

MOHAMMAD, A.; PEIRIS, J.S.M.; SCOTLAND, S.M.; WILLSHAW, G.A.; SMITH, H.R.; CHEASTY, T. A longitudinal study of vero cytotoxin producing *Escherichia coli* in cattle calves in Sri Lanka. *Epidemiol. Infect.*, 110:197-208, 1993.

MOHAMMAD, A.; PEIRIS, J.S.M.; WIJEWANTA, E.A.; MAHALINGAM, S.; GUNASEKARA, G. Role of cerocytotoxigenic *Escherichia coli* in cattle and buffalo calf diarrhoea. *FEMS Microbiol. Lett.*, 26:281-183, 1985.

MOON, H.W.; WHIPP, S.C.; ARGENZIO, R.A.; LEVINE, M.M.; GIANELLA, R.A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *E. coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.*, 41: 1340-1351, 1983.

NATARO, J.P.; SCALETSKY, I.C.A.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M.; TRABULSI, L.R. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *E. coli*. *Infect. Immun.*, 54: 378-383, 1985.

NETER, E.; WESTPHAL, O.; LUDERITZ, O.; GINO, R.M.; GORZYNSKI. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics*, 16:801-808, 1955.

O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.*, 51: 206-220, 1987.

OLIVEIRA, M.S.; CASTRO, A.F.P.; SERAFIM, M.B. Mannose-resistant haemagglutination and colonization factor among *Escherichia coli* strains isolated from pigs. *Vet. Rec.*, 26: 275-278, 1981.

OLSVIK, O., STROCKBINE, N.A. PCR detection of heat-stable, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. In: Diag. molec. microbiol., 271-276, 1993.

ONO, E.; ABE, K.; NAKAZAWA, M.; NAIKI, M. Ganglioside epitope recognized by K99 fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 57: 907-911, 1989.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; SMITH, H.W.; SOJKA, W.J. The establishment of K99, a termolabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect., B83: 31-36, 1975.

PALVA, E.T.; HIRST, T.R.; HARDY, S.J.S.; HOLMGREN, J.; RANDALL, L. Synthesis of a precursor to the B subunit of heat-labile enterotoxin in *E.coli*. J. Bacteriol., 146: 325-330, 1981.

PATON, A.W.; MANNING, P.A.; WOODROW, M.C.; PATON, J.C. Translocated intimin receptors (Tir) of shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates belonging to serogroups O26, O111, and O157 react with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome and exhibit marked sequence heterogeneity. Infect. Immun., 66:5580-5586, 1998.

PICKETT, C.L.; TWIDDY, E.M.; BELISLE, B.W.; HOLMES, R.K. Cloning of genes that encode a new heat-labile enterotoxin of *E. coli*. J. Bacteriol., 165:348-352, 1986.

PICKETT, C.L.; TWIDDY, E.M.; COKER, C.; HOLMES, R.K. Cloning, nucleotide sequence, and hybridization of the type IIb heat-labile enterotoxin gene of *E. coli*. J. Bacteriol., 171:4945-4952, 1989.

POSPISCHIL, A.; MAINIL, J.G.; MOON, H.W. Attaching and effacing bacteria in the intestines of calves and cats with diarrhea. Vet. Pathol., 24 (4): 330-334, 1987.

SALYERS, A.A. & WHITT, D.D. – Bacterial pathogenesis, a molecular approach, United States, ASM Press. 16: 190-204, 1994.

SARIDAKIS, H.O.; ELGAREL, S.A.; VIDOTTO, M.C.; GUTH, B.E.C. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups from calves with diarrhea. Vet. Microbiol., 54:145-153, 1997.

SCALETISKY, I.C.A.; MILANI, S.R.; TRABULSI, L.R.; TRAVASSOS, L.R. Isolation and characterization of the localized adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 56: 2979-2983, 1988.

SCALETISKY, I.C.A.; PEDROSO, M.Z.; FAGUNDES-NETO, U. Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* O18ab invades epithelial cells and causes persistent diarrhea. Infect. Immun., 64: 4876-4881, 1996.

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

SEARS, C.L.; KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Reviews*, 60(1):167-215, 1996.

SERAFIM, M.B.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; LEONARDO, M.B.; MONTEIRO, A.R. A single radial immune hemolysis (SRIH) test for the detection of thermolabile (LT) enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 14:473-478, 1981.

SHARIFF, M.; BHAN, M.K.; KNUTTON, S.; DAS, B.K.; SAINI, S.; KUMAR, R. Evaluation of the fluorescence actin staining test for detection of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 61: 386-389, 1993.

SMITH, H.R.; SCOTLAND, S.M.; STOKES, N.; ROWE, B. Examination of strains belonging to enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups for genes encoding EPEC adherence factor and Vero cytotoxins. *J. Med. Microbiol.*, 31:235-240, 1990.

SPERANDIO, V.; KAPER, J.B.; BORTOLINI, M.R.; NEVES, B.C.; KELLER, R.; TRABULSI, L.R. Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 164:133-139, 1998.

STALEY, T. E.; JONES, E.W.; CORLEY, L. D. Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. *Am. J. Pathol.*, 56:371-392, 1969.

STEIN, M.; KENNY, B.; STEIN, A. M.; FINLAY, B.B. Characterization of EspC, a 110-Kilodalton protein secreted by Enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *Infect. Immun.*, 64 : 6546-6554, 1996.

THOMPSON, M.R. *E. coli* heat-stable enterotoxins and their receptors. *Pathol. Immunopathol. Res.*, 6: 103-116, 1987.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354, 1979.

WHIPP, S. C. Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. *Infect. Immun.*, 58:930-934, 1990.

WIELER, L.H.; BAUERFEIND, R.; BALJER, G. Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea. *Zentralbl. Bakteri.*, 276:243-253, 1992.

WIELER, L.H.; SCHWANITZ, A.; VIELER, E.; BUSSE, B.; STEINRÜCK, H.; KAPER, J.B.; BALJER, G. Virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. *Infect. Immun.*, 66: 1604-1607, 1998.

WIELER, L.H.; VIELER, E.; ERPENSTEIN, C.; SCHLAPP, T.; STEINRÜCK, H.; BAUERFEIND, R.; BYOMI, A.; BALJER, G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. J. Clin. Microbiol., 34(12):2980-2984, 1996.

WILLSHAW, G.A.; SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R.; ROWE, B. Properties of Vero Cytotoxin-producing *Escherichia coli* of human origin of O serogroups other than O157. J. Infect. Dis., 166(4): 797-802, 1992.

YANO, T.; GARCIA, M.; LEITE, D.S.; CAMARGO, I.J.B.; CASTRO, A.F.P. Fimbria-like adhesive factor (EAF44) from verocytotoxigenic *Escherichia coli* of bovine origin. Res. Vet. Sci., 45: 418-419, 1988.

YANO, T.; OLIVEIRA, M.S.; FONTES, C.F.; ALMEIDA, A.C.P.; CASTRO, A.F.P. Detection of heat-labile (LT) enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* by the Immune Hemolysis Test: a modification for clinical use. Med. Microbiol. Immunol., 171:171-178, 1982.

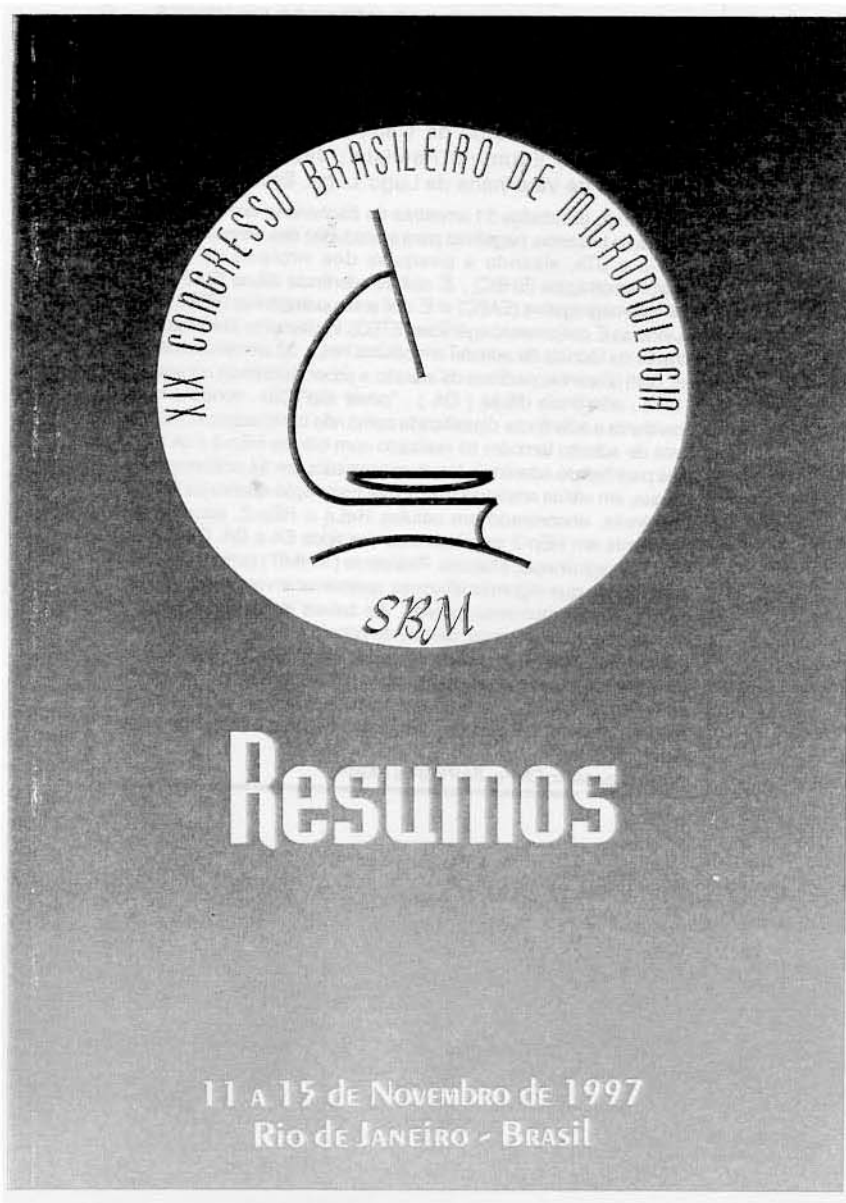
YANO, T.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; GARCIA, M.; CASTRO, A.F.P. Produção de verocitotoxina (VT) em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia. Rev. Microbiol., 17: 339-341, 1986.

YOSHIMATSU, K.; YUYAMA, Y.; ONO, E.; SYUTO, B.; NAIKI, M. New methods for isolation of K99 fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Vet. Med. Sci., 53: 119-1121, 1991.

YUTSUDO, T.; NAKABAYASHI, N.; HIRAYAMA, T.; TAKEDA, Y. Purification and some properties of a verotoxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically unrelated to Shiga toxin. Microb. Pathog., 3:21-30, 1987.

XIV. Anexos

Anexo 1. Resultados parciais apresentados no XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia.



MV-029

**POSSÍVEIS NOVOS MECANISMOS DE
PATOGENICIDADE DE AMOSTRAS DE
Escherichia coli ISOLADAS DE BOVINOS
COM DIARRÉIA E PESQUISA DE
ADESINAS, POR MÉTODOS "IN VIVO" E
"IN VITRO".**

L. Aida¹, A. Sousa¹, F. A. de Ávila², L. C. Ricci¹, M.A. J. Piton¹, M. Uemura¹, J. Blanco³ & A. F. Pestana de Castro¹.
Universidade Estadual de Campinas¹, Campinas, SP,
Universidade Estadual Paulista², Jaboticabal, SP e
Faculdade de Veterinária de Lugo³, Lugo, Espanha.

Estão sendo estudadas 51 amostras de *Escherichia coli* isoladas de diarréia de bezerros, negativas para a produção das enterotoxinas LT-I, LT-II e STa, visando a pesquisa dos virotipos de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC), excluindo as *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC). Inicialmente identificamos, através da técnica de adesão em células HeLa, 33 amostras aderentes, com diferentes padrões de adesão a saber: aderência agregativa (EA), aderência difusa (DA), "cover slip" (CS), sendo o mais prevalente a aderência classificada como não característica (NC). O teste de adesão também foi realizado com células HEp-2 e os mesmos padrões de aderência foram encontrados em 34 amostras, sendo que, em várias amostras não houve correlação quanto ao tipo de aderência, encontrado em células HeLa e HEp-2, sendo mais prevalente em HEp-2 as aderências dos tipos EA e DA. O teste de Microhemaglutinação Manose-Resistente (MHMR) também foi realizado, sendo que algumas amostras apresentaram resultado apenas com hemácias humanas, porém, em baixos títulos. Os resultados com hemácias de equinos, ovinos, de cobaia e de galinha foram negativos. Estamos ainda realizando testes de P.C.R. com a finalidade de identificar o gene *eaeA* responsável por lesões do tipo "attaching and effacing" (A/E). Embora poucas amostras tenham sido testadas, nossos primeiros resultados foram negativos para a presença deste gene.

Apoio financeiro: CNPq, FAPESP e FAEP