

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/52148

IB/ 81874

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

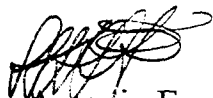


ADRIANA DE SOUSA PENTEADO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE COELHOS
NO ESTADO DE SÃO PAULO**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Adriana de Sousa Penteado
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do
título de Doutor em Genética e
Biologia Molecular, Área de
Concentração: Microbiologia


Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

UNIDADE	IB/ 812/4
Nº CHAMADA	UNICAMP
	P387c
V	EX
TOMBO BC/	52148
PROC.	16-124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	128 11.00
DATA	12/02/03
Nº CPD	

CM00179067-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P387c**Penteado, Adriana de Sousa**

Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Escherichia coli* isoladas de coelhos no Estado de São Paulo/Adriana de Sousa Penteado.

--

Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Antonio Fernando Pestana de Castro

Co-Orientador: Jorge Blanco Alvarez

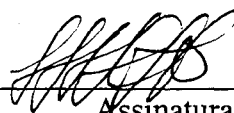
Tese(Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1.*Escherichia coli*. 2.Diarréia. 3.Coelho. I. Castro, Antonio Fernando Pestana de. II. Blanco Alvarez, Jorge. II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Data da Defesa: 18 de Outubro de 2002

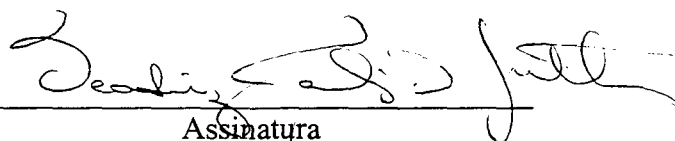
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.
Antonio Fernando Pestana de Castro



Assinatura

Profa. Dra.
Beatriz E. Cabilio Guth



Assinatura

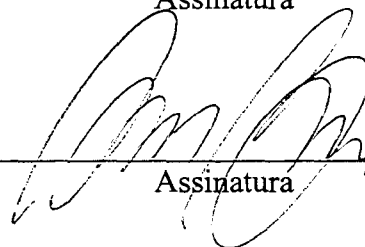
Prof. Dr.
Domingos da Silva Leite

Assinatura

Prof. Dr.
Jorge Timenetski

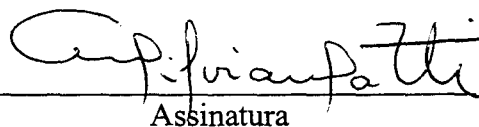
Assinatura

Prof. Dr.
Marcelo Brocchi



Assinatura

Profa. Dra.
Maria Silvia V. Gatti



Assinatura

Prof. Dr.
Tomomasa Yano



Assinatura

*Às mulheres...
profissionais,
esposas,
mães,
e especialmente àquelas que desempenham os três
papéis com amor e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Antonio Fernando Pestana de Castro, pela orientação, pelos ensinamentos, apoio, confiança e amizade durante todos estes anos.

Ao Professor Doutor Jorge Blanco da Faculdade de Veterinária, Lugo – Espanha, pelo auxílio na realização dos testes de sorologia, teste de PCR para os genes *afrA* e *afr2* e valiosa colaboração na orientação deste trabalho.

Ao Professor Doutor Miguel Blanco, da Faculdade de Veterinária, Lugo – Espanha pela colaboração nos testes de sorologia e PCR dos genes *afrA* e *afr2*.

Aos professores Clarice Weis Arns, Domingos Silva Leite e Lucila Costallat Ricci do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, pela participação do exame de Qualificação.

À Professora Doutora Beatriz Ernestina Cabilio Guth, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - UNIFESP, pela participação na banca prévia e definitiva.

À Professora Doutora Marina Baquerizo Martinez, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – FCF/USP pela participação na banca prévia.

Ao Pesquisador Waldir Pereira Elias Júnior, do Laboratório Especial de Microbiologia – Instituto Butantã, pela participação na banca prévia.

Ao Professor Doutor Marcelo Brocchi, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pela participação na banca definitiva.

À Professora Doutora Maria Sílvia Viccari Gatti, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia, UNICAMP, pela participação na banca definitiva.

Ao Professor Doutor Tomomasa Yano, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia, UNICAMP, pela participação na banca definitiva.

Ao Professor Doutor Idércio Luiz Sinhorini e Shirley Meire da Silva, do Departamento de Patologia da Faculdade de Veterinária e Zootecnia – USP, pelo grande auxílio na preparação e observação do material de microscopia eletrônica.

Ao Professor Doutor João Ramos Costa Andrade, do Departamento de Microbiologia – UERJ, pela colaboração no teste de FAS (Fluorescent Actin Staining).

À Zaira, da secretaria de pós-graduação pela paciência no esclarecimento de minhas dúvidas.

Às amigas e orientadoras emocionais Leila, Luciana, Vânia, Lilian, Lika, Maria Paula, Daniela, Sarah e Nathalia. O apoio, a paciência e o otimismo que sempre me transmitiram foram essenciais para a realização desta tese. Muito obrigada pela amizade incondicional, que foi e vai continuar sendo muito importante na minha vida.

Aos meus pais, por toda ajuda e pelo exemplo de vida.

Ao meu marido Antonio Marcos, companheiro de todas as horas.

Ao meu filho Leonardo, fonte inesgotável de alegria que ilumina até os dias mais atribulados de minha vida.

RESUMO

Um total de 178 amostras de *Escherichia coli* isoladas de coelhos com diarreia e sadios de criações do Estado de São Paulo foram sorotipadas e pesquisadas pela técnica de PCR quanto a genes de virulência. Dentre as 90 amostras (50,6%) que apresentaram o gene *eae*, 74 foram isoladas de animais diarreicos e todas, com exceção de uma, apresentaram intimina do subtipo β . Das amostras *eae*+, 72,2% apresentaram inserção de LEE em *pheU*, 12,2% em *selC* e, em 15,6% das amostras, LEE não se inseriu em nenhum dos loci testados. Todas as amostras foram negativas para genes que codificam enterotoxinas (LT-I, LT-II, STa e STb), toxinas como Stx1, Stx2, CNF1 e CNF2, além de enterohemolisina, com exceção de uma amostra que apresentou gene que codifica a toxina CNF1. O sorotipo O132:H2 prevaleceu entre os sorotipos encontrados, correspondendo a 70% das 90 amostras *eae*+, sendo que 57 destas amostras pertenceram ao biotipo 30. O gene que codifica a fimbria AF/R2 foi encontrado em 75 (83,3%) das 90 amostras *eae*+. A aderência em células HeLa foi melhor detectada em período de incubação de 6h e o teste de FAS foi positivo em 52 amostras. O exame em microscopia eletrônica revelou formações típicas da lesão A/E em células HeLa em 4 das amostras testadas. Estes dados mostram que amostras de *E. coli* isoladas de coelhos no Estado de São Paulo, possuem genótipo e fenótipo tipicamente associados a amostras patogênicas para coelhos e que colibacilos *eae*+, *afr2*+ do sorobiotipo O132:H2:B30, são predominantes dentre as amostras isoladas neste estudo.

ABSTRACT

A total of 178 *Escherichia coli* isolates from diarrheic and healthy rabbits in the São Paulo State (Brazil) were serotyped and investigated by PCR for the presence of virulence genes. Among the 90 (50.6%) isolates which possessed the *eae* gene, 74 were from diarrheic animals and all 90 but one encoded intimin β . Sixty five (72.2%) of the *eae*⁺ isolates had insertion of the LEE locus in the *pheU* locus, 11 (12.2%) in the *selC* and 14 (15.6%) did not insert in either of these loci. All isolates were negative for genes of the *E. coli* enterotoxins, Stx1, Stx2, CNF1, CNF2 and EHEC hemolysin, with one exception that possessed gene from CNF1. The O132:H2 serotype was dominant, being present in 63 isolates (70%) of the 90 the *eae*⁺ isolates, and 57 of 63 isolates of this serotype belonged to biotype 30. PCR detected the gene for AF/R2 fimbriae in 75 (83.3%) of the 90 *eae*⁺ isolates. Adherence to HeLa cells was best detected following 6 h incubation and a positive Fluorescence Actin Staining (FAS) test was given by 52 isolates. All the four *eae*⁺/FAS⁺ isolates investigated by electron microscopy showed A/E lesions in HeLa cells. These data show that isolates of *E. coli* associated with diarrhea in rabbits in State of São Paulo, possess the genotype and phenotype typically associated with rabbit enteropathogenic *E. coli*, and that *E. coli* isolates that possess the *eae* and *afr2* genes, and belonged to O132:H2:B30 serobiotpe were especially predominant.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS GERAIS.....	12
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Amostras bacterianas.....	15
4.2. Biotipagem.....	17
4.3. Determinação do sorogrupo	18
4.4. Determinação do antígeno H por sorologia.....	19
4.5. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	20
4.6. Teste de aderência em células de linhagem contínua.....	22
4.7. Teste de FAS (Fluorescent Actin Staining).....	24
4.8. Microscopia eletrônica de transmissão para observação da lesão “attaching and effacing”	25
4.8.1. Infecção.....	25
4.8.2. Fixação e contraste.....	25
4.8.3. Desidratação e inclusão.....	26
4.8.4. Preparação dos cortes para observação em microscópio eletrônico.....	27
4.9. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	27
4.9.1 Escolha dos iniciadores.....	28
4.9.2. Análise dos polimorfismos.....	28
4.9.3. Extração e quantificação do DNA.....	28
4.9.4. Reação de RAPD.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Amostras coletadas	30
5.2. Biotipagem.....	30
5.3. Sorotipagem.....	32
5.4. Pesquisa do gene <i>eae</i> e subtipo de intimina.....	34
5.5. Inserção de LEE.....	37
5.6. Fímbrias AF/R1 e AF/R2.....	37
5.7. Pesquisa de toxinas, enterotoxinas e enterohemolisina.....	39
5.8. Teste de aderência em células HeLa.....	39
5.9. Teste de FAS (Fluorescent Actin Staining).....	40
5.10. Microscopia eletrônica de transmissão.....	41
5.11. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	41
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXO.....	81

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Amostras padrão de <i>Escherichia coli</i> para diferentes fatores de virulência, seus sorogrupos e ou sorotipos.....	16
Quadro 2. Descrição e sequência dos iniciadores utilizados nos testes de PCR, temperaturas de anelamento e tamanhos dos fragmentos amplificados.....	21
Quadro 3. Sequência e classificação dos iniciadores testados na técnica de RAPD.....	28

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de fermentação de carboidratos correspondente aos biotipos identificados em amostras de <i>E. coli</i> isoladas de coelhos, segundo classificação de Camguilhem e Milon (1989).....	31
Tabela 2. Número de amostras e porcentagem de identificação dos diferentes biotipos em amostras de <i>E. coli</i> isoladas de coelhos.....	32
Tabela 3. Sorotipos encontrados em amostras de <i>E. coli</i> isoladas de coelhos e sua correlação com biotipos.....	33
Tabela 4. Número de amostras de <i>E. coli</i> isoladas de coelhos com e sem diarreia e porcentagem de amostras <i>eae</i> ⁺	34
Tabela 5. Relação entre sorotipos e biotipos nas amostras de <i>E. coli eae</i> ⁺ e <i>eae</i> ⁻ isoladas de coelhos.....	35
Tabela 6. Relação dos sorotipos e biotipos em amostras de <i>E. coli eae</i> ⁺ isoladas de coelhos com e sem diarreia.....	36
Tabela 7. Relação entre locus de inserção de LEE e sorotipos encontrados em amostras de <i>E. coli</i> isoladas de coelhos.....	37
Tabela 8. Relação entre sorotipos e presença do gene <i>afr2</i> em amostras de <i>E. coli eae</i> ⁺ isoladas de coelhos.....	38
Tabela 9. Padrões de aderência, teste de FAS e presença do gene <i>afr2</i> em amostras de <i>E. coli</i> isoladas de coelhos em testes de 3 e 6 horas.....	40
Tabela 10. Número de polimorfismos dos iniciadores utilizados na técnica de RAPD.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Detecção do gene <i>eae</i> em algumas amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de coelhos pela técnica de PCR.	44
Figura 2. Detecção do subtipo β de intimina através da amplificação, pela técnica PCR, de fragmento da porção C-terminal do gene <i>eae</i> de algumas amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de coelhos.....	45
Figura 3. Reação de PCR par determinação do locus de inserção de LEE em <i>pheU</i> de algumas amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de coelhos.	46
Figura 4. Resultados do teste de PCR para amplificação das regiões de inserção de LEE em <i>selC</i> de duas amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de coelhos.	47
Figura 5. Amostra de <i>Escherichia coli</i> isolada de coelho (amostra 7) apresentando aderência LAL (“localizada-like”) com período de incubação de 6h em células HeLa. Aumento final: 1000x.....	48
Figura 6. Amostra de <i>Escherichia coli</i> isolada de coelho (amostra 200) apresentando aderência AA (agregativa) com período de incubação de 6h em células HeLa. Aumento final: 1000x.....	48
Figura 7A. Amostra de <i>Escherichia coli</i> isolada de coelho (amostra 130) apresentando aderência LAL, observada sob contraste de fase	49
Figura 7B. Amostra de <i>Escherichia coli</i> isolada de coelho (amostra 130) apresentando reação de FAS positiva em células HeLa.....	49
Figura 8. Lesão “attaching and effacing” em célula HeLa provocada pela amostra <i>E. coli</i> 189 isolada de coelho. Aumento final 21.900x.....	50

GRÁFICOS

Gráfico 1. Representação do número de amostras de <i>E. coli</i> isoladas de coelhos, amostras <i>eae</i> +, amostras que apresentaram intimina β , amostras com inserção de LEE em <i>selC</i> , <i>pheU</i> e indeterminada e amostras <i>afr2</i> +.....	38
Gráfico 2. Número de amostras de <i>E. coli</i> observado em cada padrão de aderência obtido de testes empregando período de incubação de 3h e 6h.....	41
DENDROGRAMA.....	51

1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Escherichia coli* tem sido isolada com frequência de surtos de diarreia que acometem coelhos de criações de países europeus (Prescott, 1978; Peeters *et al.*, 1988; Camguilhem e Milon, 1989; Blanco *et al.*, 1997a). Esta patogenia afeta animais lactentes e principalmente desmamados, resultando em prejuízos econômicos ao produtor pela perda de peso e mortalidade que varia de 25 a 40%, atingindo em média 30% dos animais infectados (Peeters, 1987, 1993; Blanco *et al.*, 1993b).

A enterite em coelhos, além dos colibacilos, pode ser provocada por outros agentes bacterianos, tais como *Clostridium spiroforme*, *Bacillus piliformis* e *Salmonella spp.* Rotavírus e parasitas (*Eimeria* e *Cryptosporidium*) também já foram descritos. No entanto, infecções por *Eimeria*, *E. coli* e rotavírus são as mais frequentes, podendo existir infecções por mais de um agente, como *E. coli* e *Eimeria* ou *E. coli* e rotavírus (Blanco *et al.*, 1993b, 1997a; Peeters *et al.*, 1984c, 1993; Percy *et al.*, 1993).

Normalmente *E. coli* é encontrada em concentrações muito baixas nas fezes de coelhos sãos, quando comparada à concentração da mesma bactéria em fezes do homem ou de outros animais. Esta característica se deve ao fato da presença de ácidos graxos voláteis (AGV) no ceco de coelhos o que mantém o pH em valores inferiores ao adequado para o desenvolvimento de *E. coli* (Blanco *et al.*, 1997a). Entretanto, problemas na taxa de trânsito intestinal, métodos de alimentação e, principalmente, a composição alimentar, podem alterar condições entéricas normais e favorecer a proliferação de *E. coli*. Exemplos destes problemas podem ser dietas ricas em proteínas (maiores que 18%), que provocam um incremento de amônio cecal, promovendo elevação do pH ou também, dietas de alta concentração de fibras (maiores que 17%) e baixa concentração de amido, o que favorece o decréscimo na concentração de AGV, tornando propício o ambiente para a proliferação de colibacilos. Condições de estresse, como falta de água para beber, frio e enfermidades respiratórias também podem contribuir para um aumento da infecção (Blanco *et al.*, 1997a, Varga e Pesti, 1982). Portanto, o crescimento intenso de *Escherichia coli* a partir da cultura de fezes de coelhos, pode ser um indício da patogenicidade desta amostra (Varga e Pesti, 1982).

Em 1977, Cantey e Blake trabalhando com a amostra de *Escherichia coli* RDEC-1, sorotipo O15:H-, isolada de diarreia de coelho, identificaram um novo mecanismo de patogenicidade capaz de causar esta patologia. Esta amostra não produzia enterotoxinas e fimbrias (K88 e K99), até então descritas como fatores de virulência em amostras de *E. coli* causadoras de diarreia em bezerros e leitões, além de não ser invasora. Os estudos neste campo evoluíram e, atualmente sabe-se que este mecanismo de patogenicidade está relacionado à lesão “attaching and effacing” (A/E), sendo que amostras de *E. coli* que apresentam este fenótipo foram inicialmente denominadas de AEEC (Attaching and Effacing *Escherichia coli*) (Moon *et al.*, 1983). Amostras de *E. coli* isoladas de coelhos que possuem estas características, também são denominadas REPEC (Rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*) (Robins-Browne *et al.*, 1994).

A lesão “attaching and effacing” caracteriza-se pela destruição das microvilosidades intestinais no local de aderência, contato íntimo da bactéria com a célula hospedeira e formação de uma estrutura semelhante a um pedestal nesta célula (Moon *et al.*, 1983), processo que induz à diarreia por um complexo mecanismo (Kaper *et al.*, 1998).

Bactérias indutoras da lesão A/E possuem, no cromossomo bacteriano, uma inserção de 35kpb que corresponde a uma ilha de patogenicidade denominada LEE (Locus of Enterocyte Effacement). Nesta ilha estão contidos todos os genes que codificam produtos envolvidos na formação da lesão A/E. Entre estes estão os genes *esp* (de EPEC secreted proteins) que codificam as proteínas EspA, EspB, EspD e EspF. Com exceção de EspF, estas proteínas formam um filamento transitório de superfície que liga diretamente a bactéria à célula eucariótica infectada. A proteína EspA é o maior componente deste filamento, formando uma estrutura tubular de translocação com uma extremidade ligada à bactéria e outra à célula hospedeira (Kenny *et al.*, 1996; Knutton *et al.*, 1998). EspB é então translocada para a célula eucariótica por um processo dependente de EspA e se localiza entre as membranas e o citoplasma desta célula, formando um poro por onde substâncias exógenas são transportadas para o interior da célula (Donnenberg *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1998). Da mesma forma, EspD também é translocada da bactéria para a célula hospedeira, integrando-se à membrana citoplasmática e contribuindo para a formação do poro nesta membrana (Lai *et al.*, 1997; Kresse *et al.*, 1999).

Recentemente, McNamara *et al.*, (2001) reportaram que a proteína EspF também é translocada para a célula hospedeira. No entanto, não tem envolvimento direto na formação da lesão A/E. Sua função estaria ligada à promoção da ruptura da barreira intestinal no processo da formação desta lesão.

Além dos genes *esp*, LEE também contém genes que codificam um aparato secretor tipo III, cuja função é conhecida por promover transporte de proteínas efetoras através da parede bacteriana para células eucarióticas infectadas. Em EPEC, estes genes foram descritos por Jarvis *et al.*, (1995), que denominaram-nos de genes *esc* (secretion of *E. coli* proteins). Aparentemente, o sistema de secreção tipo III localizado na bactéria, em conjunto com a estrutura construída pelas proteínas Esps, formam uma ponte de ligação entre bactéria e célula eucariótica infectada, através da qual são translocadas proteínas que promovem eventos na célula hospedeira, os quais irão culminar na geração da lesão A/E (Vallance e Finlay, 2000; Wilson *et al.*, 2001).

Considerado como marcador de virulência de amostras AEEC, o gene *eae*, também contido em LEE, codifica uma proteína de 94kDa, denominada intimina, a qual é responsável pela adesão íntima entre bactéria e célula hospedeira, passo fundamental para a formação da lesão A/E (Jerse *et al.*, 1990, 1991). A ligação da intimina com seu receptor na célula hospedeira, consiste de um processo diferenciado entre os mecanismos empregados normalmente entre bactéria e células infectadas, sendo que *E. coli* transfere seu próprio receptor até à célula eucariótica. Este receptor consiste de uma proteína de membrana denominada Tir (Translocated intimin receptor), também codificada por gene contido em LEE, que atinge a célula via aparato secretor tipo III e proteínas Esp, onde sofre fosforilação da tirosina e se insere na membrana celular, apta a se ligar à intimina. O complexo Tir/intimina direciona eventos de sinalização na célula hospedeira e leva à reorganização de proteínas do citoesqueleto para a formação da lesão “attaching and effacing” (Kenny *et al.*, 1997).

Dois chaperones foram identificados em LEE, CesD para EspB e EspD (Wainwright e Kaper, 1998) e CesT para Tir (Abe *et al.*, 1999).

O modelo de formação da lesão A/E foi proposto inicialmente por Knutton *et al.*, (1987), contando com as contribuições sucessivas de Donnenberg e Kaper, (1992),

Donnenberg *et al.*, (1997) e por Hicks *et al.*, (1998), estes últimos propondo um modelo de quatro estágios para formação da lesão A/E em amostras EPEC (*Enteropathogenic Escherichia coli*). Estes estágios envolvem primeiramente a adesão inicial não íntima da bactéria a células epiteliais do intestino, mediadas por outras adesinas que não o Bfp (Bundle Forming Pilus). O segundo estágio compreende a sinalização de eventos e fosforilação de proteínas na célula hospedeira por proteínas secretadas pela bactéria. O terceiro estágio caracteriza-se pela adesão íntima da bactéria à superfície apical da célula epitelial, mediada pela proteína intimina ligada à Tir, o que desencadeia a formação da lesão A/E, pelo recrutamento de proteínas do citoesqueleto, como talina, miosina ezrina e, principalmente, actina (Finlay *et al.*, 1992).

O teste de FAS (Fluorescent Actin Staining) é utilizado na identificação de amostras A/E positivas empregando a coloração de agregados de actina polimerizada no ponto de aderência da bactéria à célula hospedeira, com faloidina marcada com fluoresceína. A visualização de pontos de fluorescência que, em contraste de fase, correspondem a pontos de aderência da bactéria à célula hospedeira, corresponde a teste de FAS positivo, indicando que a amostra em questão, é fenotipicamente capaz de causar lesão “attaching and effacing” em células eucarióticas, (Knutton *et al.*, 1989).

No quarto e último estágio de formação da lesão A/E, ocorre a produção de microcolônias pelas bactérias, provocada pela adesão das mesmas umas as outras, mediada pela fimbria Bfp. No entanto, amostras que não apresentam esta fimbria também são capazes de produzir lesão A/E (Girón *et al.*, 1991, 1993). Assim, o quarto estágio da lesão só é desenvolvido por amostras que possuem Bfp.

A fimbria Bfp está associada à presença de um plasmídio de 60MDa denominado EAF (EPEC adherence factor) (Baldini *et al.*, 1983). Esta fimbria está relacionada à aderência localizada (LA – Localized Adherence) expressa por amostras EPEC às células epiteliais cultivadas “in vitro”. Este padrão de aderência é caracterizado pela formação de agrupamentos compactos das bactérias sobre as células eucarióticas, após período de 3 horas de incubação. Também entre amostras EPEC é encontrado o padrão LAL (Localized adherence-like), expresso por amostras EAF negativas. Caracteriza-se pela formação de agrupamentos bacterianos menos compactos que os observados na aderência LA. Este padrão

é observado apenas em ensaios com período de incubação de 6 horas. O padrão LA/DA, (Localized and Diffuse Adherence), que ocorre em amostras que apresentam o plasmídeo EAF, além de genes responsáveis pelo fenótipo de aderência difusa, apresenta bactérias formando grupos compactos, mas também bactérias aderindo de maneira dispersa sobre células HEp-2, padrão obtido com 3 horas de incubação (Scaletsky *et al.*, 1996).

Os padrões de aderência expressos por amostras de *E. coli* em células HEp-2 e HeLa contribuíram na definição de mais dois grupos desta bactéria, a saber: EAEC (Enteraggative *Escherichia coli*) e DAEC (Diffusely Adhering *Escherichia coli*). Amostras EAEC apresentam aderência denominada de agregativa (AA), que caracteriza-se pela disposição de bactérias sobre as células de linhagem e sobre a lamínula, formando paliçadas ao redor das células (Nataro *et al.*, 1987, Nataro, 1996b). Este grupo de bactéria tem sido relacionado à diarreia persistente no homem, especialmente em crianças (Bhan *et al.*, 1989). Amostras DAEC apresentam aderência difusa (DA), a qual caracteriza-se pela aderência das bactérias sobre as células de linhagem de maneira dispersa e uniforme (Bilge *et al.*, 1989; Nataro, 1996b). Apesar de relacionada à diarreia em humanos, o papel de amostras DA na etiologia desta doença ainda é controverso (Scaletsky *et al.*, 1999).

Ainda em relação à LEE, já foram descritos três sítios de inserção desta ilha de patogenicidade em amostras AEEC. O primeiro relato descreve a inserção de LEE em *selC*, gene que codifica tRNA para selenocisteína de amostras EPEC O127:H6 e EHEC O157:H7 (McDaniel *et al.*, 1995). Em seguida, Sperandio *et al.*, (1998) reportaram que, em determinados sorotipos de amostras STEC (Shiga-Toxin *Escherichia coli*), LEE inseria-se em *pheU*, gene que codifica tRNA para fenilalanina, sendo que nas amostras EPEC do sorotipo O111ab:H25, LEE não está inserido em nenhum dos dois loci (*selC* e *pheU*), sugerindo a existência de uma outra região de inserção desta ilha de patogenicidade. Jores *et al.*, em 2001, estudando amostra Stx+ do sorotipo O103:H2, isolada de bovino, reportaram que LEE estaria inserido dentro de uma grande ilha de patogenicidade, localizada na proximidade do gene *pheV*. Este gene é idêntico ao *pheU*, mas se encontra em uma região diferente no cromossomo bacteriano.

Apesar da lesão “attaching and effacing” ser o principal fator de virulência descrito em amostras de *Escherichia coli* isoladas de coelhos, até o momento, não é exclusivo desta

espécie. Amostras AEEC foram isoladas de vários outros animais, como suínos, bovinos, cães e gatos (Zhu *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1994; Broes *et al.*, 1998; Popschil *et al.*, 1987). No entanto, a maioria das pesquisas que estudam a lesão “attaching and effacing” foi, e ainda é, realizada com amostras de origem humana, as quais definem uma classe particular denominada de EPEC. Esta classe de colibacilos causa diarreia em crianças com geralmente até um ano de idade (Levine, 1987). Além desta, a classe das EHEC (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*) também inclui amostras AEEC. Representantes deste grupo, além de possuírem a região LEE, também produzem toxinas de Shiga (Stx1 e Stx2) e enterohemolisinas (EHEC-Hly), sendo conhecidas por causarem a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) e Colite Hemorrágica (CH) no homem (Tzipori *et al.*, 1986; Griffin *et al.*, 1988).

Mesmo sendo amplamente estudada nas diferentes classes da bactéria *Escherichia coli*, a região LEE não é exclusiva desta espécie. Também foi identificada em *Hafnia alvei*, isolada de crianças com diarreia (Albert *et al.*, 1992) e *Citrobacter rodentium*, isolados de ratos (Schauer e Falkow, 1993).

LEE está presente em amostras REPEC e é suficiente para que estas amostras produzam lesão A/E em células eucarióticas infectadas, conforme foi observado por Karaolis *et al.*, (1997). A análise completa da sequência de LEE da amostra RDEC-1, protótipo REPEC, foi realizada por Zhu *et al.*, (2001) e comparada com a mesma sequência de amostras EPEC (O127:H6) e EHEC (O157:H7). Esta análise revelou alto grau de homologia (>95% de identidade) na sequência de nucleotídeos que correspondem aos genes que codificam componentes do aparato secretor tipo III, chaperone Ces e regulador Ler. Em contraste, maior divergência foi observada (66 a 88% de identidade) entre os genes que codificam proteínas envolvidas na interação bactéria/hospedeiro, como *eae* e aqueles que codificam proteínas secretadas (Tir e Esps). O locus de inserção de LEE da amostra RDEC-1 também foi pesquisado por estes autores, sendo que a inserção em *selC* não foi observada. Até onde se saiba, não foram realizadas pesquisas de comparação entre amostras de *E. coli* de coelhos através de análise genética, como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), por exemplo.

A técnica de RAPD utiliza pequenos iniciadores, normalmente de 9 a 10pb, de sequência arbitrária, geradas ao acaso, na amplificação de fragmentos de DNA. Estes iniciadores não possuem sequências palindrômicas e contém 50 a 80% de GC (Williams *et al.*, 1990). Cada iniciador é utilizado isoladamente na amplificação de fragmentos de DNA de uma única fonte de material genômico. O polimorfismo resultante desta reação consiste na capacidade ou não de cada iniciador gerar fragmentos de DNA amplificados a partir do iniciador utilizado. Este polimorfismo pode ser obtido de DNA de espécies diferentes, sem necessidade de variações da técnica, ou conhecimento da sequência do DNA molde (Williams *et al.*, 1990, Welsh *et al.*, 1991). Deste modo, esta técnica também se presta, em microbiologia, para avaliação da diversidade genética em linhagens bacterianas (Bando *et al.*, 1998).

Apesar do menor grau de similaridade entre os genes *eae* de diferentes amostras AEEC, existe uma região conservada destes genes que codificam a porção N-terminal da proteína intimina, o que permite empregar técnicas como PCR e Hibridização, utilizando iniciadores e sondas genéticas universais na pesquisa deste gene. (Pohl *et al.*, 1993; Leroy *et al.*, 1994; Blanco *et al.*, 1997b; Agin *et al.*, 1996, Agin e Wolf, 1997). Tal fato possibilitou que a pesquisa deste gene fosse amplamente utilizada na identificação de amostras AEEC.

Por outro lado, a variabilidade dos 280 resíduos de aminoácidos da porção C-terminal da proteína intimina das amostras AEEC de diversas origens, levou à distinção de famílias. Adu-Bobbie *et al.*, (1998), utilizando reações imunológicas e genotípicas, conseguiram identificar quatro famílias de intiminas: α , β , γ , δ , e Oswald *et al.*, (2000), identificaram a intimina ϵ . Existem inclusive, iniciadores específicos para a identificação destes subtipos de intiminas (Adu-Bobbie *et al.*, 1998; Oswald *et al.*, 2000). Cada família pode conter sorotipos de diferentes classes de *E. coli*, como por exemplo a intimina β , que é expressa por amostras EPEC típica (O119:H6) e atípicas (O111:H-; O111:H2; O114:H2; O119:H2 e O128:H2), EHEC (O26:H11, O26:H-) e sorotipo de amostras AEEC de coelhos, (O15:H-) (Agin e Wolf, 1997, Adu-Bobbie *et al.*, 1998). A porção C-terminal da intimina é responsável pela sua ligação à proteína Tir (Frankel *et al.*, 1994). Porém, pouco se sabe a respeito da importância da variação de intiminas na especificidade entre a bactéria e hospedeiro, principalmente

porque o receptor desta proteína é produzido pela própria bactéria e translocado até a célula infectada (Kenny *et al.*, 1997).

Existem, no entanto, amostras que não expressam nenhuma das intiminas já descritas na literatura, sendo portanto, classificadas como “não tipáveis” (NT) (Adu-Bobbie *et al.*, 1998).

Apesar de haver variações entre os genes de LEE de RDEC-1 e amostras de outras origens, refletindo em particularidades na patogênese e especificidade de hospedeiro, a lesão A/E, manifestação fenotípica de LEE, é produzida de maneira similar nestas amostras (Karaolis *et al.*, 1997; Heezo *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001).

Uma particularidade da amostra REPEC O103 estudada por Nougayrede *et al.*, (1999), é a sua capacidade de causar um efeito citopático (CPE) lento e progressivo caracterizado pelo recrutamento de vinculina e formação de fibras de actina em células HeLa, o que não foi observado pela amostra EPEC E2348/69. Este efeito citopático leva à morte celular após 5 dias de interação entre bactéria e célula hospedeira e é EspA, EspB e EspD dependente e Tir e intimina independente (Marchès *et al.*, 2000). Estes mesmos autores também pesquisaram o papel das proteínas Tir e intimina na virulência da amostra O103:H2, isolada de coelhos e verificaram que estas proteínas são essenciais na formação da lesão A/E, mas que mutantes deficientes na produção destas proteínas são capazes de causar resposta inflamatória no intestino de coelhos.

Entre as adesinas descritas em amostras REPEC as fimbrias AF/R1 e AF/R2 são consideradas fatores de virulência pois permitem a colonização do epitélio intestinal de coelhos, potencializando a atividade dos genes de LEE. A fimbria AF/R1 foi identificada apenas na amostra RDEC-1, por O’Hanley e Cantey em 1985. É responsável pela aderência inicial desta amostra às células epiteliais do intestino, promovendo a colonização do mesmo. No entanto, mutantes deficientes na produção da fimbria AF/R1 são capazes de causar lesão A/E, ainda que em menor grau que a amostra selvagem (Cantey *et al.*, 1989). A fimbria AF/R1 é composta de subunidades protéicas, sendo que a maior delas possui peso molecular aparente de 19kDa. A expressão desta fimbria é mediada por um plasmídeo de 86MDa (Berendson *et al.*, 1983). Placas de Peyer possuem receptores para esta fimbria (Von Moll e Cantey, 1997).

A adesina AF/R2, mais recentemente caracterizada, foi identificada na amostra REPEC B10 (O103:H2), não fermentadora do carboidrato ramnose. Possui codificação cromossômica e aderência manose-resistente. Também é composta de subunidades protéicas, sendo que a maior possui 32kDa. Dois genes estão envolvidos na sua síntese, apresentando homologia com subunidade dos genes que codificam a fimbria K88 (ETEC de suínos) e a adesina não fimbrial CS31A (ETEC de bovinos) (Fiederling *et al.*, 1997). Esta proteína de 32kDa foi inicialmente descrita por Milon *et al.*, 1990, os quais demonstraram que amostras detentoras desta proteína foram capazes de aderir de maneira difusa às células HeLa. Licois *et al.*, (1991) descreveram, também em uma amostra O103:H2 (GV), a presença de um plasmídeo de 117kb (pREC-1) que está ligado à aderência da amostra GV ao epitélio intestinal de coelhos e também à formação da lesão “attaching and effacing”, sendo que amostras curadas deste plasmídeo perdem a capacidade de aderência, e amostras K12, que recebem este plasmídeo, adquirem capacidade de aderência. Ainda não está esclarecido se este plasmídeo contém os genes de AF/R2. O plasmídeo de 117kb também carrega genes que conferem resistência a vários antibióticos, o que aumentaria a virulência destes isolados. Mutantes deficientes deste plasmídeo, são incapazes de causar diarreia ou mortalidade após a inoculação experimental em coelhos (Reynaud *et al.*, 1991).

Recentemente, foi identificada em uma amostra REPEC a presença de uma fimbria denominada de RaI que parece exercer papel importante na adesão da bactéria nos primeiros estágios de formação da lesão A/E. Mutantes deficientes desta fimbria são capazes, ainda que em menor número, de causar a lesão e mutantes deficientes do gene *eae*, contendo a fimbria RaI, colonizam o intestino e não causam lesão A/E. Aparentemente, RaI e intimina agem de forma cooperativa na promoção da lesão “attaching and effacing” (Krejany *et al.*, 2000).

Uma das características da patogenia de amostras de *E. coli* em coelhos pode ser constatada por estudos desenvolvidos por Peeters *et al.*, (1984a,b) os quais revelaram a existência de dois tipos de *E. coli* enteropatogênicas para coelhos. Um deles, provoca diarreia em coelhos não desmamados, e coloniza todo o intestino delgado e grosso. Um outro tipo, presente em animais desmamados, coloniza apenas o íleo, ceco e colon, sendo que ambos os tipos apresentam indistintamente a lesão A/E.

No que se refere a classificações sorológicas, comprovou-se através de estudos com cepas isoladas na Bélgica e Holanda, que a maior parte das amostras AEEC de coelhos pertencem a um reduzido número de sorotipos, sendo que as cepas patogênicas para coelhos não desmamados pertencem, na maioria, ao sorotipo O109:H2, diferindo dos sorotipos apresentados pelas amostras patogênicas para coelhos desmamados, os quais são: O15:H-, O20:H7, O103:H2, O128:H2, O132:H2 e O153:H7 (Varga e Pesti, 1982; Peeters *et al.*, 1984a,b; 1988). No entanto, os sorotipos O103:H2 e O15:H- destacam-se pela maior virulência quando comparados aos demais sorotipos. O sorotipo O103:H2 é isolado em maior número na França e Espanha, enquanto os sorotipos O15:H-, O109:H2 e O132:H2 são mais frequentes na Bélgica e Holanda (Blanco *et al.*, 1997a; Peeters *et al.*, 1988)

Afim de auxiliar na caracterização e classificação de amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas para coelhos, um sistema interessante e prático de biotipagem foi desenvolvido por Okerman e Devriese (1985). Este sistema consiste na classificação de amostras de *Escherichia coli* isoladas de coelho com diarreia frente às suas capacidades de fermentação de uma bateria composta por diferentes carboidratos. Atualmente, modificado por Camguilhem e Milon (1989), este teste compreende uma bateria de 5 carboidratos: sorbose, dulcitol, D-rafinose, sacarose, L-ramnose. Cada carboidrato recebe um número, deste modo, o biotipo é definido pela somatória dos números dos carboidratos fermentados.

A classificação conjunta de biotipos e sorotipos permitiu caracterizar amostras patogênicas em países da Europa, como Camguilhem e Milon (1989), que na França, identificaram amostras *eae+* do sorogrupo O103, não fermentadoras de ramnose, patogênicas para coelhos desmamados. Blanco *et al.*, (1993b, 1996a, 1997d) na Espanha, também descreveram amostras altamente virulentas classificadas como *eae+* O103:H14 e H2 não fermentadoras de ramnose.

O plasmídeo de 117kb descrito por Licois *et al.*, (1991) em amostras do sorogrupo O103, anteriormente citado, quando curado, torna amostras mutantes capazes de fermentar a ramnose. No entanto, este fenótipo não é recuperado após a introdução do plasmídeo em amostra anteriormente curada do mesmo (Reynaud *et al.*, 1991).

Quanto às toxinas, existem poucos relatos sobre a presença destes fatores de virulência em amostras REPEC isoladas de coelhos com diarreia. O'Brien *et al.*, (1982) identificaram

pequena quantidade de Stx produzida pela amostra RDEC-1, no entanto, Pohl *et al.*, (1993) ao testarem 41 amostras AEEC isoladas de coelhos quanto à produção de Stx1 e Stx2, incluindo a amostra RDEC-1, identificaram apenas uma amostra pertencente ao sorotipo O26:H11 como produtora de Stx1, sendo que a amostra RDEC-1 apresentou resultado negativo para produção das toxinas testadas.

Apesar da grande contribuição brasileira na pesquisa de amostras EPEC de origem humana (Trabulsi *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 1996; Scaletsky *et al.*, 1988), a área veterinária conta com poucos trabalhos dedicados ao estudo de amostras AEEC. Na verdade, a pesquisa de amostras desta natureza em coelhos, além de contribuir para a produção animal, elucidando um agente de diarreia que tanto prejuízo traz ao criador, não deixa de fornecer dados importantes para a bacteriologia humana, uma vez que os fatores de virulência são, neste caso, basicamente os mesmos em amostras de diferentes origens. Particularmente no caso de trabalhos com amostras REPEC, não existem relatos, até o momento, de contribuições da pesquisa brasileira neste campo.

Diante destas constatações, a pesquisa de colibacilos isolados de coelhos se justifica e se faz necessária, não só porque este animal se presta à pesquisas de amostras AEEC como excelente modelo biológico, mas principalmente por ser inédita com amostras obtidas de animais de criações brasileiras.

2. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste estudo foi isolar amostras de *Escherichia coli* de fezes normais e diarreicas de coelhos com menos de 3 meses de idade, provenientes de diferentes granjas do Estado de São Paulo, caracterizá-las quanto ao biotipo e sorotipo e, através de estudos fenotípicos e genotípicos, pesquisar marcadores e fatores de virulência comuns a amostras AEEC, classe de colibacilos relacionada à diarreia em coelhos.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Com os objetivos anteriormente descritos, foi seguido o seguinte plano de trabalho:

1. Coletar amostras de fezes diarréicas (caso) e não diarréicas (controle) de coelhos com menos de 3 meses de idade, provenientes de várias criações do Estado de São Paulo.
2. Isolar e identificar amostras de *Escherichia coli* através da cultura das fezes coletadas e de provas bioquímicas adequadas.
3. Proceder a biotipagem das amostras de *E. coli* isoladas, através da capacidade fermentativa dos seguintes carboidratos: dulcitol, D-rafinose, L-ramnose, sorbose e sacarose.
4. Realizar o teste de sorotipagem das amostras classificadas quanto ao biotipo, determinando assim, os sorobiotipos mais frequentes entre as amostras de *E. coli* isoladas.
5. Pesquisar a presença do gene *eae*, principal responsável pela lesão “attaching and effacing”, entre as amostras isoladas, através da prova de PCR (Polymerase Chain Reaction), empregando iniciadores específicos para amplificação de um fragmento do gene *eae* de amostra EPEC humana, correspondente à região N-terminal da intimina.
6. Pela técnica de PCR, utilizando iniciadores específicos, pesquisar as porções variáveis do gene *eae* que codificam os vários subtipos de intiminas (α , β , γ , δ e ϵ .) das amostras de *E. coli eae*⁺ isoladas.
7. Através do mesmo teste de PCR, pesquisar a presença de genes que codificam enterotoxinas (LT-I, LT-II, STa e STb), e toxinas como Stx1, Stx2, CNF1 e CNF2, além de enterohemolisina (EHEC-Hly), nas amostras em estudo.

8. Determinar a presença dos genes que produzem as adesinas AF/R1 e AF/R2 através da técnica de PCR.
9. Verificar o locus de inserção de LEE (*selC* e *pheU*) das amostras *eae*⁺ também pela técnica de PCR.
10. Realizar, com amostras *eae*⁺, o teste de aderência em células HeLa, empregando metodologia de 3 e 6 horas de incubação da amostra bacteriana com as células de linhagem.
11. Com base no teste de aderência, escolher amostras para o teste de FAS (Fluorescent Actin Staining).
12. Examinar por microscopia eletrônica de transmissão a capacidade ou não de algumas amostras FAS⁺ causarem lesão A/E em células HeLa.
13. Realizar o teste de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) com amostras escolhidas segundo critérios como biotipos, sorotipos, presença do gene *eae*, e procedência da amostra, inclusive empregando amostras isoladas na Espanha e também a amostra protótipo RDEC-1.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras bacterianas

As amostras de fezes foram obtidas de 298 coelhos desmamados de menos de 3 meses de idade, provenientes de 12 propriedades localizadas no Estado de São Paulo, Brasil.

A coleta do material fecal foi realizada através da introdução de suabes uretrais de haste de alumínio no reto dos animais, sendo que, após a coleta, estes suabes foram depositados em tubos contendo meio de transporte Stuart (CE 0546 – sterile R – Stuart Chiaro ALU/VISC. – Italy).

Os materiais fecais coletados foram transportados em isopor contendo gelo até o Laboratório de Bacteriologia Médica e Veterinária, no Instituto de Ciências Biomédicas – II (ICB-II), USP – São Paulo, onde, realizou-se a cultura em ágar MacConkey (Difco). Foram avaliadas pelo menos 3 colônias fermentadoras de lactose de cada amostra fecal coletada. No entanto, foi estudada apenas uma amostra de *E. coli*, dentre as três isoladas. Deste modo, cada amostra de *E. coli* estudada correspondeu a um animal examinado.

A identificação de amostras de *Escherichia coli* foi realizada através de série bioquímica empregando os meios de EPM (Toledo *et al.*, 1982a), MILi (Toledo *et al.*, 1982b) e Citrato de Simmons (Edwards e Ewing, 1972). Após identificadas, as amostras de *E. coli* foram cultivadas em BHI (Brain Heart Infusion - Difco) por 18h, e um volume de 2,5ml desta cultura foi misturado a 2,5ml de solução de glicerol 80% em salina 0,85% e posteriormente mantidas a -70°C. Para os testes subseqüentes, as amostras foram estocadas em Lignières (Bier, O., 1966).

As amostras padrão empregadas neste estudo encontram-se descritas no Quadro 1.

Quadro 1. Amostras padrão de *Escherichia coli* para diferentes fatores de virulência, seus sorogrupos e ou sorotipos

<i>Designação da Amostra</i>	<i>Controle</i>	<i>Sorogrupo ou sorotipo</i>	<i>Origem</i>
K12C600	negativo para todos os testes	não fornecido	Silveira, W. D., Brasil
E2348/69	positivo para gene <i>eae</i> , intimina α , aderência localizada, inserção de LEE em <i>selC</i> , reação de FAS, lesão “attaching and effacing”	O127:H6	Trabulsi, L. R., Brasil
P-17	positivo para LT-I, STb	não fornecido	Blanco, J., Espanha
B62	positivo para LT-II	não fornecido	Blanco, J., Espanha
B41	positivo para STa	não fornecido	Blanco, J., Espanha
O157-157	positivo para Stx1/Stx2, <i>eae</i> , enterohemolisina, intimina γ	O157:H7	Blanco, J., Espanha
PC-D	positivo para CNF1	não fornecido	Blanco, J., Espanha
B26-a	positivo para CNF2	não fornecido	Blanco, J., Espanha
0202-6	positivo para inserção de LEE em <i>pheU</i>	R:H11 cruzando com 21 e 41	Gomes, T.A.T., Brasil
B171	positivo para Intimina β	O111:H-	Trabulsi, L.R., Brasil
ICC95	positivo para Intimina δ	O86:H34	Trabulsi, L.R., Brasil
PMK5	positivo para Intimina ϵ	O103:H2	Oswald, E., França
C1845	positivo para Aderência Difusa	O75:H-	Gomes, T.A.T., Brasil
0431-4/85	positivo para Aderência Agregativa	O64:H4	Gomes, T.A.T., Brasil
R267	fermentadora dos carboidratos sorbose, dulcitol, D-rafinose, sacarose, L-ramnose.	O128	Blanco, J., Espanha
R13	não fermentadora do carboridrato sorbose e L-ramnose	O103	Blanco, J., Espanha
R99	não fermentadora do carboridrato dulcitol	não fornecido	Blanco, J., Espanha
R67	não fermentadora do carboridrato L-rafinose	O2	Blanco, J., Espanha
R229	não fermentadora do carboridrato sacarose	não fornecido	Blanco, J., Espanha
RDEC-1	positivo para fimbria AF/R1	O15:H-	Blanco, J., Espanha
AF/R2	positivo para fimbria AF/R2	não fornecido	Blanco, J., Espanha

4.2. Biotipagem

O primeiro passo na caracterização das amostras de *E. coli* isoladas foi a determinação do biotipo através da técnica descrita por Camguilhem e Milon (1989). Esta técnica tem como base a capacidade das amostras testadas em fermentar os seguintes carboidratos: sorbose, dulcitol, D-rafinose, sacarose e L-ramnose. Para tanto, empregou-se meio Base Caldo Vermelho de Fenol (Difco) que foi preparado segundo especificações do fabricante. Retirou-se um volume de 10% do meio total preparado, onde foi dissolvido o carboidrato na concentração de 1% do volume final. Esta solução do meio acrescido do carboidrato foi filtrada em filtros 0,22 μ m (Millipore) e acrescentada em condições de esterilidade ao restante do meio previamente autoclavado e acrescido de 2% de ágar. Esta preparação final foi vertida em placas de Petri, em volume aproximado de 20ml por placa. Cada amostra foi, então, semeada em “spot” nestas placas contendo, cada uma, um carboidrato diferente. Também foram semeados controles positivos e negativos para cada carboidrato.

O meio Ágar Vermelho de Fenol possui o indicador vermelho de fenol que, em pH ácido, se torna amarelo e, em pH básico, vermelho. Amostras que fermentam um determinado carboidrato, produzem ácido e viram o indicador para amarelo; amostras que não fermentam o carboidrato, viram o indicador para vermelho em virtude de ligeira alcalinização do meio resultante do metabolismo proteico, após incubação a 37°C por 24-48h.

Segundo classificação de Camguilhem e Milon (1989), cada carboidrato recebe um número de código, a saber: sorbose (código 1), dulcitol (código 2), D-rafinose (código 4), sacarose (código 8) e L-ramnose (código 16). O biotipo é dado pela somatória dos números de código dos carboidratos que a amostra fermentou. Por exemplo, se uma amostra fermentou os carboidratos: D-rafinose, sacarose, L-ramnose ($4+8+16=28$) ela é classificada como biotipo 28.

4.3. Determinação do sorogrupo

Na sequência de caracterização das amostras isoladas foi realizada a determinação do sorogrupo O ou sorogrupagem. Este teste foi executado segundo metodologia descrita por Guineé *et al.*, (1972) modificada por Blanco *et al.*, 1992.

Os anti-soros testados foram produzidos no Laboratório de Referência de *E. coli* (LREC) (Lugo, Espanha), sendo todos absorvidos a fim de remover aglutininas não específicas. Todas as amostras foram testadas com Kit dos anti-soros mais comuns entre amostras de *E. coli* isoladas de coelhos: O1, O2, O8, O9, O15; O20, O21, O26, O45, O49, O64, O78, O101, O103, O109, O115, O128, O132, O138, O139, O141, O147, O149, O153, O157. No entanto, as amostras classificadas como *eae*⁺, (citadas no item 4.5) e algumas *eae*⁻, que não tiveram seu sorogrupo definido, foram enviadas para o laboratório acima referido a fim de se procederem testes com anti-soros preparados contra os antígenos de O1 a O181.

Para o teste, as amostras de *E. coli* foram semeadas por toda a superfície do meio de TSA (Difco) disposto em placas de Petri, a fim de se obter o máximo de crescimento bacteriano. Após incubação a 37°C por 18h, o crescimento foi recolhido em salina estéril com auxílio de uma alça de Drigalski e a suspensão bacteriana obtida foi ajustada para $1,8 \times 10^9$ bactérias por ml, segundo o tubo 6 da escala de MacFarland, com a mesma salina utilizada na suspensão. O antígeno O foi preparado, aquecendo-se esta 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 e O20 e O101 para inativação do antígeno K do tipo A. Estes antígenos recobrem o antígeno O e impedem a sua reação com o anti-soro. Afim de facilitar a visualização da aglutinação, foi adicionado ao antígeno O preparado, igual volume de salina 0,85% formalizada (0,5%, v/v), contendo violeta de genciana a 0,005% (p/v).

A reação foi feita misturando-se 50µl de antígeno e 50µl de anti-soro diluído 1/80 em salina estéril contendo azida sódica (1g/1000ml), em poços de fundo em “V” de placas de microtítulo de 96 poços. A leitura foi feita após incubação das placas a 37°C, por 18h.

Reações positivas para um dado anti-soro consistiram de amostras em suspensão e reações negativas, pela formação de “botão” no fundo do poço.

A confirmação do sorogrupo foi realizada através da titulação da reação de aglutinação. Para tanto, procedeu-se a diluição do anti-soro, em volume de 50µl, nas mesmas placas utilizadas no teste anterior e, deste modo a diluição inicial foi de 1/80 e final de 1/40.960. Adicionou-se, então, 50µl da amostra que foi aglutinante na diluição de 1/80, em todas as diluições. Desta forma a diluição final do anti-soro no primeiro poço foi de 1/160 e no décimo de 1/81.920 (razão 2). Após incubação por 18h, procedeu-se a leitura. Amostras que apresentaram aglutinação a partir da diluição de 1/320 do anti-soro foram consideradas como pertencentes ao sorogrupo correspondente ao anti-soro testado.

4.4. Determinação do antígeno H por sorologia

As amostras submetidas ao teste para determinação do antígeno H foram, na maioria dos casos, apenas aquelas que tiveram o sorogrupo definido pelo teste anterior, excluindo-se, portanto, as não-tipadas (NT). Os anti-soros H (H1-H56) foram obtidos do Statens Seruminstitut (Copenhague, Dinamarca).

O desenvolvimento deste experimento compreendeu o cultivo das amostras por três etapas consecutivas de 48h cada a 37°C, em tubos em “U” contendo meio para motilidade (Motility GI medium - Difco) a fim de potencializar a expressão dos flagelos. Amostras que se apresentaram imóveis neste primeiro passo, foram cultivadas por mais três vezes em tubos em “U”. Caso, se apesar destas passagens as amostras continuaram imóveis, foram consideradas H-. Em seguida, as amostras móveis foram cultivadas em infusão de cérebro e coração (Difco, E.E.U.U.) a 37°C, por 8h sob agitação de 80rpm. Foram adicionados 7ml de salina formalizada (0,5%, v/v) em cada tubo e deixados em repouso por uma noite à temperatura ambiente. A turbidez do tubo assim tratado foi comparado ao tubo 2 da escala de MacFarland. Posteriormente, adicionou-se em tubos tipo Kahn, 0,5ml da suspensão bacteriana formalizada e 0,5ml de anti-soro diluído a 1/200, que foram incubados por 2h a 45°C em banho-maria. Este processo foi realizado com os 56 soros H monovalentes testados (H1 a H56).

Amostras positivas para um determinado anti-soro apresentavam aglutinação em forma de uma película no fundo do tubo e sobrenadante transparente. Amostras negativas continuavam turvas.

4.5. *PCR (Polymerase Chain Reaction)*

Os fatores de virulência geneticamente pesquisados encontram-se relacionados no Quadro 2, bem como a sequência dos iniciadores utilizados, tamanho do fragmento amplificado, temperatura de anelamento dos iniciadores e referência bibliográfica ou número de acesso no “GenBank”, no caso de iniciadores ainda não descritos, desenhados por Miguel Blanco, LREC, Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.

Cada reação de amplificação foi realizada em um volume de 50µl de solução, contendo 5µl do DNA molde previamente preparado por fervura a 10min, 25pmol de cada iniciador; 0,1mM (cada) de dATP, dGTP, dCTP e dTTP (Gibco BRL); 10mM Tris HCl (pH 8.4) (Gibco BRL); 25mM KCl (Gibco BRL); 0,75mM MgCl₂; (Gibco-BRL) e 1,25U de Taq DNA Polimerase (Gibco-BRL). O produto da reação de PCR foi observado pela eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Trisma Base 10,5g/l; Ácido Bórico 5,5g/l; EDTA 4ml/l de solução 0,5M pH8,0), empregando sempre o padrão de peso molecular de 1Kb DNA Ladder ou 50pb DNA Ladder (Gibco-BRL), conforme o tamanho do fragmento amplificado. Após a eletroforese, o gel foi corado em brometo de etídio (0,5µg/ml) e observado em transiluminador de UV.

Reações positivas consistiam na presença de banda na amostra testada que coincidissem na posição do gel com a banda expressa pelo padrão positivo, contido no mesmo lote de amplificação daquela amostra, além da correspondência do peso molecular destas bandas (DNA Ladder), com aquele descrito pelo designador dos iniciadores.

Quadro 2. Descrição e sequência dos iniciadores utilizados nos testes de PCR, temperaturas de anelamento e tamanhos dos fragmentos amplificados

Gene ou fator de virulência	Iniciador	Sequência 5' - 3'	Temp. de anelamento (°C)	fragmento amplificado (pb)	Referência Bibliográfica ou N° de acesso ("GenBank")
<i>eae</i>	<i>eaeA</i> <i>eaeB</i>	ACG TTG CAG CAT GGG TAA CTC GAT CGG CAA CAG TTT CAC CTG	56	815	Gannon <i>et al.</i> , 1993
Reverso ^a	Ru	TTT ATG TGC AGC CCC CCA T			Adu Bobie <i>et al.</i> , 1998
Intimina α	α	CCT TAG GTA AGT TAA GT	52	$\cong 558$	Adu Bobie <i>et al.</i> , 1998
Intimina β	β	TAA GGA TTT TGG GAC CC	50	$\cong 562$	Adu Bobie <i>et al.</i> , 1998
Intimina γ	γ	ACA AAC TTT GGG ATG TTC	58	$\cong 562$	Adu Bobie <i>et al.</i> , 1998
Intimina δ	δ	TAC GGA TTT TGG GGC AT	52	$\cong 563$	Adu Bobie <i>et al.</i> , 1998
Intimina ε	SK1 LP5	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC AGC TCA CTC GTA GAT GAC GGC AAG CG*	68	2.608	Oswald <i>et al.</i> , 2000
<i>pheU</i>	K913 K914	CAT CGG CTG GCG GAA GAT AT CGC TTA AAT CGT GGC GTC	52	300 ^b	Sperandio <i>et al.</i> , 1998
<i>selC</i> intacto	K260 K261	GAG CGA ATA TTC CGA TAT CTG GTT CCT GCA AAT AAA CAC GGC GCA T	60	527	McDaniel <i>et al.</i> , 1995
<i>selC</i> junção dir.	K260 K255	GAG CGA ATA TTC CGA TAT CTG GTT GGT TGA GTC GAT TGA TCT CTG G	60	418	McDaniel <i>et al.</i> , 1995
<i>selC</i> junção esq.	K295 K296	CGC CGA TTT TTC TTA GCC CA CAT TCT GAA ACA AAC TGC TC		418	McDaniel <i>et al.</i> , 1995
<i>stx</i> 1	A B	CGC TGA ATG TCA TTC GCT CTG C CGT GGT ATA GCT ACT GTC ACC	55	302	M19473
<i>stx</i> 2	A C	CTT CGG TAT CCT ATT CCC GG CTG CTG TGA CAG TGA CAA AAC GC	55	515	M59432
Ent- <i>hly</i>	A B	GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A	60	1.551	Schmidt <i>et al.</i> , 1995
LT-I	A B	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC	48	696	Schultsz <i>et al.</i> , 1994
STa	A B	ATT TTT ATT TCT GTA TTG TCT TT GGA TTA CAA CAC AGT TCA CAG CAG T	48	176	M25607
LT-II	A B	AGA TAT AAT GAT GGA TAT GTA TC TAA CCC TCG AAA TAA ATC TC	52	300	M28523
STb	A B	ATC GCA TTT CTT CTT GCA TC G GGC GCC AAA GCA TGC TCC	60	172	Blanco <i>et al.</i> , 1997c
CNF geral	A B	CTG GAC TCG AGG TGG TGG CTC CTG TCA ACC ACA GCC	63	533	Blanco <i>et al.</i> , 1996b
CNF1	A B	GAA CTT ATT AAG GAT AGT CAT TAT TTA TAA CGC TG	46	543	Blanco <i>et al.</i> , 1996b
CNF2	A B	AAT CTA ATT AAA GAG AAC CAT GCT TTG TAT ATC TA	46	543	Blanco <i>et al.</i> , 1996b
AF/R1	A B	CGG GAT CAG CAA TTG CTG CTC ATC GCC ACT AAC TTC ACA TGG	60	312	M32083
AF/R2	A B	GTT TCG TTA CCG ATG AGG CAC C GAC AGA CGG CTA ACC ACC TCC	60	463	U77302

^a. Iniciador reverso utilizado com cada um dos iniciadores para identificação das intiminas $\alpha, \beta, \gamma, \delta$.

^b. Reações positivas utilizando iniciadores *pheU*, correspondiam a não amplificação de fragmentos, indicando a interrupção do locus *pheU*, e amostras negativas correspondiam a amplificação de um fragmento de 300pb.

4.6. Teste de aderência em células de linhagem contínua

A capacidade de aderência e determinação de seu padrão, foram pesquisados nas amostras de *E. coli eae+*, utilizando células HeLa (carcinoma epitelial de cérvix humana, ATCC: CCL2) como modelo, assim como pode ser realizado em pesquisas de amostras enteropatogênicas para humanos (Scaletsky *et al.*, 1988; Nataro *et al.*, 1985; e Levine, 1987). A metodologia utilizada foi a atualmente adotada pela UNIFESP (Escola Paulista de Medicina) com algumas modificações. Desta forma, as células HeLa foram cultivadas em atmosfera de CO₂ em microplacas (Falcon, USA) com 24 poços contendo em cada poço lamínulas redondas de 13mm de diâmetro, que foram previamente esterilizadas por banho de álcool etílico P.A. (Merck) e flambagem em bico de Bunsen. A cada poço, foi adicionado 1ml de células em suspensão em meio para cultivo de células Dulbecco's Modified Eagle Medium-D-MEM (Gibco™, cat. n° 11965-09L) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco™, cat. n° 10270-106) e 1% da solução em salina 0,85% dos antibióticos penicilina G (10.000U/ml) e estreptomicina (10.000µg/ml) (Gibco BRL, cat. n° 15140-148). O acompanhamento do crescimento das monocamadas celulares foi feito após 24-48h em microscópio invertido. Havendo crescimento de camada semi-confluyente com 50% ou mais de área recoberta, desde que as células se apresentassem aparentemente normais a este exame (baixa refração, sem descolamento), a cultura foi considerada ideal para o teste de aderência.

Para infecção das células HeLa, as amostras de *E. coli* foram cultivadas a 37°C por 18h, em 3ml de TSB (Tryptic Soy Broth - Difco) em cultura estática. Inicialmente, o meio de cultura celular dos poços da placa previamente cultivada foi cuidadosamente retirado, com o auxílio de micropipetas de 1000µl com ponteiros estéreis. As células foram posteriormente lavadas com PBS (tampão salina-fosfato: NaCl 8g/l; KCl 0,2g/l; Na₂HPO₄ 1,15g/l; KH₂PO₄ 0,2g/l) pH7,4; 0,01M estéril por 3 vezes para a retirada de resíduos de antibióticos. Após estes procedimentos, a cada poço da placa foram adicionados 960µl do meio de cultura celular contendo 2% de soro fetal bovino e 1% de D-manose (Difco), acrescida ao meio por filtração em filtros 0,22µm (Millipore). Em seguida procedeu-se à inoculação, feita em duplicata, de 40µl do cultivo bacteriano a ser testado, além dos padrões de aderência: Difusa (DA),

Aderência Localizada (LA) e Aderência Agregativa (AA), e da amostra *E. coli* K12 C600, que é não aderente.

Transcorrido o período de 3h a 37°C de incubação em estufa comum, os poços foram novamente lavados por 10 vezes com 1ml de PBS, para que as bactérias que não aderiram fossem removidas. Após as lavagens, as lamínulas foram fixadas pela adição de 1ml de Metanol P.A. (Merck) em cada poço, e mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo 15min. Em seguida, foram coradas com May-Grunwald a 10% e Giemsa a 5% por 5 e 20min, respectivamente. Realizada a coloração, procedeu-se à lavagem das lamínulas com água destilada, as quais foram posteriormente retiradas das placas, secas e montadas em lâminas de microscopia para visualização em microscópio óptico.

A presença ou não de aderência, bem como o tipo da mesma, foi observada em microscópio óptico comum utilizando-se, inicialmente, um aumento de 320x e, em seguida, sob objetiva de imersão. Para a definição do tipo de adesão foram utilizados critérios descritos por Scaletsky *et al.* (1988, 1996), Nataro *et al.* (1985) e Levine (1987).

Para o teste que empregou metodologia utilizando 6h de incubação, desenvolveu-se a mesma metodologia empregada no teste que compreendeu período de incubação de 3h da bactéria com células Hela, sendo que após as três primeiras horas de incubação, realizou-se 3 lavagens sucessivas da monocamada celular infectada com PBS estéril, utilizando uma ponteira estéril para cada amostra. Concluindo-se a lavagem, 1ml de meio de cultura celular fresco, contendo 2% de soro fetal bovino e 1% de D-manose era adicionado a cada poço, sendo a placa incubada por mais 3h. Os demais procedimentos foram idênticos aos utilizados na metodologia de 3h de incubação.

4.7. Teste de FAS (*Fluorescent Actin Staining*)

O teste de FAS foi realizado com a finalidade de comprovar o fenótipo de “attaching and effacing” das amostras de *E. coli* que possuíam o gene *eae* detectado pela técnica de PCR. No entanto, apenas as amostras que aderiram satisfatoriamente à células HeLa, independente do padrão que apresentaram, foram testadas. Deste modo, a metodologia desenvolvida no teste de FAS baseou-se em recomendações de Knutton *et al.*, (1989), sendo que o primeiro estágio deste teste empregou o ensaio de aderência em células HeLa. Nesse ensaio, utilizou-se a metodologia de 6h no período de incubação da amostra de *E. coli* com as células de linhagem, em estufa comum. Após a incubação, a monocamada infectada foi lavada com PBS por 6 vezes e, em seguida, foi fixada com solução de formaldeído (8% em PBS) preparado com formalina a 37% (Carlo Erba), por 15min. Após este período, procedeu-se nova lavagem de 3 vezes com o mesmo tampão e acrescentou-se Triton X-100 (Sigma) a 0,1% em PBS a fim de abrir poros na membrana celular e permitir a passagem das substâncias a serem acrescentadas em etapas posteriores ao compartimento intracelular. Nova lavagem com PBS foi realizada, também por 3 vezes. Em seguida, adicionou-se 10µl de solução de faloidina-FITC (Sigma), composto que compreende faloidina conjugada à fluoresceína, preparada em PBS, na concentração de 50µg/ml. Estas substâncias permaneceram em contato com a monocamada celular e bactérias por um período de 30min em ausência de luz. Na sequência, a monocamada celular foi lavada 3 vezes por 10min cada, com PBS, e as lamínulas montadas em lâminas para microscopia sobre gotas de glicerol diluído em PBS na proporção de 9 partes glicerol para 1 parte de PBS.

A observação em microscópio de contraste de fase e fluorescência foi realizada em seguida, sob aumento de 1000x, sendo que cada ponto de fluorescência identificado era imediatamente observado sob contraste de fase, a fim de verificar se este correspondia ao ponto de aderência da bactéria à célula HeLa.

A amostra controle positivo E2348/69 foi incluída no teste, bem como o controle negativo K12 C600.

4.8. Microscopia eletrônica de transmissão para observação da lesão “*attaching and effacing*”

Para o exame em microscópio eletrônico, foram selecionadas as amostras 7, 115, 136 e 189, dentre as amostras de *E. coli* isoladas, sendo todas *eae*⁺ e FAS⁺.

4.8.1. Infecção

Para tanto, células HeLa foram cultivadas em garrafas de 5cm², com meio D-MEM acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina até atingirem semi-confluência. A monocamada celular foi inicialmente lavada com PBS estéril e, após reposição de 5ml do meio de crescimento desprovido de antibióticos e acrescido de 2% de soro fetal bovino e 1% de D-manose, foi realizada a inoculação do tapete celular com 200µl de cultura bacteriana, composta do crescimento da amostra de *E. coli* a ser testada por 18h em 3ml de TSB em cultura estática. A monocamada celular inoculada foi incubada por 3h a 37°C em estufa comum e, após este período, lavada com PBS estéril por 3 vezes. O meio de cultivo celular, acrescido de 2% de soro fetal bovino e 1% de D-manose foi repostado e procedeu-se à incubação por mais 3h. Em seguida, realizou-se a lavagem da monocamada infectada por 10 vezes com o mesmo tampão.

4.8.2. Fixação e contraste

A monocamada celular infectada foi fixada pela adição de 2ml de solução de glutaraldeído (0,48ml de glutaraldeído; 3ml de tampão fosfato; 2,5ml de H₂O deionizada) (tampão fosfato, pH7,4; 0,2M – 7,62g/l KH₂PO₄; 38,60g/l Na₂HPO₄.7H₂O), por no mínimo 2h. Para retirada do fixador, a monocamada foi submetida a três lavagens sucessivas de 5min cada com salina 0,9%. Em seguida foi desprendida da garrafa com auxílio de uma haste plástica específica para tal procedimento, sendo o material recolhido com auxílio de micropipeta e depositado em tubos tipo Eppendorfs. Para preparar as células em suspensão para o contraste, a salina foi retirada pela centrifugação a 3.400rpm por 5min em centrífuga refrigerada.

A fim de possibilitar visualização, o material foi contrastado com tetróxido de ósmio preparado na concentração de 1% em tampão fosfato 0,1M e adicionado em volume suficiente para cobrir o sedimento. Após a homogeneização, as células em suspensão foram incubadas por 24h. Transcorrido este período, realizou-se uma centrifugação a 3.400rpm por 5min para retirada do ósmio e três lavagens sucessivas com salina 0,9% e centrifugações nas mesmas condições. Em seguida, adicionou-se às células infectadas acetato de uranila (Polysciences, Inc.) a 0,5%, preparado em água bi-destilada e deionizada em quantidade suficiente para cobrir o sedimento, e incubou-se por mais 24h (Reynolds, 1963; Watson, 1963.). Transcorrido este período, o material foi centrifugado, sendo o sobrenadante desprezado, e o sedimento resultante adicionado de ágar fundido. Após 24h a 4°C, o ágar contendo as células foi recortado e colocado em uranila por no mínimo de 2h e máximo de 24h (Luft e Glauert, 1984).

4.8.3. *Desidratação e Inclusão*

Os blocos de ágar com o material celular foram submetidos à desidratação por uma bateria composta de diferentes concentrações de acetona (Merck) em H₂O bi-destilada e deionizada (30%, 50%, 70% e 90%), onde permaneciam por 10min em cada etapa, sendo posteriormente submetidos a três etapas de desidratação em acetona pura, permanecendo por 10min cada etapa. A inclusão do material em resina foi realizada gradualmente, seguindo etapas de 1h cada, que consistiram da adição sucessiva das seguintes misturas de acetona e resina: 3ml/1ml; 2ml/2ml; 1ml/3ml e resina pura sendo a última etapa realizada a 37°C, e as demais, à temperatura ambiente. Em seguida os blocos foram colocados em moldes de inclusão e o volume restante preenchido com resina pura e mantidos em estufa a 60°C por 72h.

4.8.4. *Preparação dos cortes para observação em microscópio eletrônico*

Após polimerização da resina, os blocos foram trimados com a finalidade de retirar excesso de resina, e cortados em micrótomo (SorvalMT 5000) para obtenção de cortes semi-finos de 200nm-300nm. Estes cortes foram corados com azul de toluidina para serem utilizados na verificação da qualidade do material processado e principalmente na delimitação da área a ser submetida a cortes ultra-finos (50nm-70nm) obtidos no mesmo micrótomo. Os cortes ultra-finos foram depositados em telas de cobre de 150-200 “mesh”, próprias para microscopia eletrônica. As telas com material foram, então, contrastadas com acetato de uranila a 2% em água destilada e citrato de chumbo por etapas de 7min com cada contrastante e, em seguida, analisadas em microscópio eletrônico (Phillips EM 201) localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo.

Como controle positivo de formação da lesão A/E, foi utilizada a amostra E2348/69 e controle negativo, K12 C600.

4.9. *RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)*

Neste estudo, o teste de RAPD foi empregado com a finalidade de se realizar comparação genética de 31 amostras de *E. coli* (1, 7, 25, 40, 50, 68, 109, 126, 128, 137, 143, 151, 169, 178, 194, 199, 203, 232, 237, 246, A, B, C, D, Z, V, m, R86, R120, R136, RDEC-1), escolhidas segundo critérios como: local de coleta da amostra fecal, presença do gene *eae*, sorotipo e biotipo apresentados, além de contarmos com amostras de *E. coli* isoladas de coelhos na Espanha, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Jorge Blanco (Universidade de Lugo, Espanha). Estas amostras são: R86, R120, R136, as quais apresentaram sorogrupos comuns ao encontrados por esta pesquisa. Contou também com a amostra protótipo RDEC-1 cedida pelo mesmo pesquisador. A metodologia empregada foi baseada na técnica descrita por Bando *et al.*, (1998).

4.9.1. Escolha dos iniciadores

Os iniciadores foram escolhidos segundo sua capacidade em gerar bom número de polimorfismos e bom padrão de amplificação, com bandas nítidas e reproduzíveis. Foram testados 7 iniciadores cuja sequência e classificação estão descritos no Quadro 3:

Quadro 3. Sequência e classificação dos iniciadores testados na técnica de RAPD

Iniciador	Sequência	Classificação
OPR3	ACA CAG AGG G	Excelente
OPR4	CCC GTA GCA C	Regular
OPR5	GAC CTA GTG G	Ruim
OPR6	GTC TAC GGC A	Bom
OPR7	ACT GGC CTG A	Regular
OPR8	CCC GTT GCC T	Bom
OPR11	GTA GCC GTC T	Bom

4.9.2. Análise dos polimorfismos

A análise estatística foi realizada através do programa NTSYS-pc (“Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System”), versão 1.7 (Exeter Software, Setauked, N.Y.). A similaridade entre as amostras foi estimada com o auxílio dos coeficientes de Jaccard.

4.9.3. Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA foi realizada segundo metodologia sugerida pelo fabricante (Promega) para o Kit Wizard® Genomic DNA Purification. O DNA extraído foi quantificado empregando o Kit DNA Quantitation Standards Phage λ DNA (Gibco BRL), os quais, resolvidos em conjunto com as amostras de DNA extraído em gel de agarose a 1% preparado

em TBE, permitiram, através de comparações entre bandas dos padrões e bandas das amostras, a quantificação destas últimas. Uma vez quantificada, a concentração de DNA foi ajustada para 5ng/ μ l em água Milli-Q estéril, aliquotadas e estocadas a -20°C .

4.9.4. *Reação de RAPD*

A reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) que gerou o perfil de bandas de cada amostra testada foi realizada em tubos de 200 μ l tipo Eppendorffs, para volume final de 20 μ l, contendo 20mM Tris-HCl (pH8,4), 50mM KCl, 2,5mM MgCl_2 , 200 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,4 μ M de iniciador (Operon), 10ng de DNA, 1,5 unidades de Taq DNA Polymerase, por reação. A amplificação foi realizada em 40 ciclos das seguintes temperaturas: 94°C por 45seg; 36°C por 45seg; e 72°C por 2min.

Em seguida, o DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% preparado em tampão TBE. Cada corrida eletroforética obrigatoriamente conteve nas extremidades, a adição do marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Gibco-BRL) para comparação dos fragmentos amplificados. Após a corrida, os géis foram mergulhados em solução de brometo de etídio (0,5 μ g/ml), observados em transiluminador de U.V. e fotodocumentados por câmara tipo Polaroid.

Cada gel de eletroforese documentado teve seu perfil de bandas transferido milimetricamente para um gráfico do programa Excel (Windows), tendo sempre como base de referência as distâncias entre as bandas do padrão de peso molecular. Em seguida, todas as amostras de um mesmo iniciador foram transpostas para um gráfico em comum, sofrendo um processo de equivalência de bandas entre os diversos géis, o qual teve sempre o padrão de peso molecular como parâmetro. Para a análise dos perfis de banda de cada amostra amplificada e transposta para o gráfico, além da construção do dendrograma, foi utilizado o programa NTSYS.

5. RESULTADOS

5.1. Amostras coletadas

Foram coletadas 298 amostras fecais de coelhos, sendo que destas, 236 foram provenientes de fezes diarréicas e 62 de fezes não-diarréicas.

Destas 298 amostras fecais, foram isoladas 178 amostras de *Escherichia coli*, correspondendo a 59,7% das amostras fecais coletadas, sendo que cada amostra bacteriana estudada correspondeu a um animal pesquisado. O número de amostras bacterianas isoladas de fezes diarréicas foi de 148, enquanto 30 amostras foram isoladas de fezes normais. Todas as amostras de *E. coli* isoladas estão citadas como ANEXO na Tabela Geral, localizada na página 81, a qual apresenta a discriminação dos resultados obtidos no estudo de cada amostra, com exceção do exame em microscopia eletrônica e teste de RAPD.

5.2. Biotipagem

A técnica de biotipagem permitiu identificar 13 biotipos distintos entre as 178 amostras de *E. coli* estudadas, sendo que o perfil de cada biotipo encontrado está descrito na Tabela 1. Os biotipos 30 (96 amostras) e 28 (39 amostras) foram identificados como mais freqüentes entre as amostras de *E. coli* isoladas de coelhos. Não foram observadas diferenças de biotipos identificados entre amostras isoladas de fezes diarréicas e normais.

A quantidade e porcentagem de cada um dos biotipos encontrados neste estudo estão descritos na Tabela 2.

Tabela 1. Perfil de fermentação de carboidratos correspondente aos biotipos identificados em amostras de *E. coli* isoladas de coelhos, segundo classificação de Camguilhem e Milon (1989)

<i>Biotipo</i>	<i>Sorbose</i> (código 1)	<i>Dulcitol</i> (código 2)	<i>D-Rafinose</i> (código 4)	<i>Sacarose</i> (código 8)	<i>L-Ramnose</i> (código 16)
B2	- ^a	+ ^b	-	-	-
B9 ^c	+	-	-	+	-
B16	-	-	-	-	+
B17	+	-	-	-	+
B18	-	+	-	-	+
B19	+	+	-	-	+
B24	-	-	-	+	+
B25	+	-	-	+	+
B26	-	+	-	+	+
B28	-	-	+	+	+
B29	+	-	+	+	+
B30	-	+	+	+	+
B31	+	+	+	+	+

^a: Não fermentação do carboidrato em questão.

^b: Fermentação do carboidrato em questão.

^c: O biotipo é dado pela somatória dos códigos de cada carboidrato que a amostra fermentou.

No caso: biotipo 9 = sorbose (código 1) + sacarose (código 8).

Tabela 2. Número de amostras e porcentagem de identificação dos diferentes biotipos em amostras de *E. coli* isoladas de coelhos

<i>Biotipo</i>	<i>Nº de amostras positivas identificadas</i> <i>(n=178)</i>	<i>Porcentagem</i> <i>(%)</i>
B2	1	0,6
B9	2	1,1
B16	4	2,2
B17	4	2,2
B18	3	1,7
B19	5	2,8
B24	4	2,2
B25	2	1,1
B26	7	3,9
B28	39	21,9
B29	7	3,9
B30	96	53,9
B31	4	2,2

5.3. Sorotipagem

Foram identificados 11 sorotipos distintos entre as amostras de *E. coli* isoladas de coelhos. Dentre estes, o sorotipo O132:H2 foi encontrado em 63 amostras, o que corresponde a 35,4% das amostras estudadas, demonstrando predominância deste sorotipo em relação aos demais identificados. O número de amostras que não tiveram seu sorotipo definido (não tipável – NT) foi expressivo, com 62 amostras (34,8%). Além do sorotipo O132:H2, os sorotipos O128:H2 (3,4%) e O153:H7 (3,4%) também foram identificados.

Os demais sorotipos encontrados, bem como a quantidade de amostras de cada sorotipo estão relacionados na Tabela 3, onde foram incluídos os biotipos relacionados a cada sorotipo.

Não foi observada relação entre biotipo com algum sorotipo em particular. Tomando-se, por exemplo, o biotipo 30, ao qual pertenceu grande parte das amostras estudadas. Pôde-se observar que este biotipo se encontra distribuído pela maioria dos sorotipos descritos (O132:H2, 128:H2, O153:H7, O41:H-, O110:H6, O126:H-, O20:H28) além de amostras não tipadas.

Tabela 3. Sorotipos encontrados em amostras de *E. coli* isoladas de coelhos e sua correlação com biotipos

<i>Sorotipo</i>	<i>Nº de amostras (%) (n=178)</i>	<i>Biotipos (Nº de amostras)</i>
O132:H2	63 (35,4%)	B30(57), B28(5), B24(1)
O103:H19	12 (6,7%)	B28
O128:H2	6 (3,4%)	B28(4), B30(2)
O153:H7	6 (3,4%)	B28(5), B30(1)
O41:H ^a	5 (2,8%)	B30
NT ^b :H6	5 (2,8%)	B26(4), B24(1)
O110:H6	4 (2,2%)	B30(2), B26 (2)
O2:NR ^c	3 (1,7%)	B29(1), B25(2)
O4:H1	2 (1,1%)	B17
O21:NR	2 (1,1%)	B19
O126:H-	2 (1,1%)	B28(1), B30(1)
O1:H45	1 (0,6%)	B26
O20:H28	1 (0,6%)	B30
O126:H20	1 (0,6%)	B28
O128:NR	1 (0,6%)	B30
O145:NT ^d	1 (0,6%)	B31
NT:H1	1 (0,6%)	B30
NT:NR	62 (34,8%)	B30(25), B28(11), B18(3), B19(3), B24(2), B29(6), B16(4), B9(2), B31(3), B2(1), B17(2)

^a: Amostra imóvel.

^b: Não tipável com soros O utilizados.

^c: Teste não realizado.

^d: Não tipável com soros H utilizados.

5.4. Pesquisa do gene *eae* e subtipo de intimina

A técnica de PCR utilizada na pesquisa do gene *eae* revelou que este gene estava presente em 90 das 178 amostras estudadas, o que corresponde a 50,6% entre o total de amostras. Das 90 amostras *eae*⁺, 82,2% foram isoladas de fezes diarreicas. A frequência do gene *eae* em amostras de *E. coli* isoladas de fezes normais e diarreicas esta descrita na Tabela 4.

Quanto à determinação do subtipo de intimina, todas as amostras *eae*⁺ apresentaram o subtipo β , com exceção da amostra 25 que não reagiu com nenhum dos iniciadores utilizados na identificação dos subtipos de intiminas estudados: α , β , γ , δ e ϵ .

Das amostras *eae*⁺, 63 (70,0%) pertenceram ao sorotipo O132:H2. A relação destas amostras com biotipos por elas apresentados, permitiu identificar o sorobiotipo O132:H2:B30 como predominantes entre as amostras que apresentaram o gene *eae* (63,3%). Os sorotipos O128:H2 (6 amostras) e O153:H7 (6 amostras) também foram identificados em amostras *eae*⁺. Amostras não sorotipadas foram, na maioria, *eae*⁻ (62 amostras). Estes resultados podem ser observados na Tabela 5.

A relação de biotipos, sorotipos e presença do gene *eae* entre amostras de *E. coli* isoladas de animais com diarreia e animais sadios pode ser observada na Tabela 6.

Exemplos de eletroforese do produto amplificado na pesquisa do gene *eae* e pesquisa do subtipo de intimina podem ser observados na Figura 1 e Figura 2, respectivamente.

Tabela 4. Número de amostras de *E. coli* isoladas de coelhos com e sem diarreia e número e porcentagem de amostras *eae*⁺.

<i>Origem</i>	<i>Nº de amostras</i>	<i>Nº de amostras eae⁺</i>
Fezes diarreicas	148	74 (50,0%)
Fezes não-diarreicas	30	16 (53,3%)
Total	178	90 (50,6%)

Tabela 5. Relação entre sorotipos e biotipos nas amostras de *E. coli eae+* e *eae-* isoladas de coelhos

<i>Amostras eae+</i> (n=90)		<i>Amostras eae-</i> (n=88)	
<i>Sorotipos</i> (Nº de amostras)	<i>Biotipos</i> (Nº de amostras)	<i>Sorotipos</i> (Nº de amostras)	<i>Biotipos</i> (Nº de amostras)
O132:H2 (63)	B30(57), B28(5), B24(1)	O103:H19 (12)	B28
O128:H2 (6)	B28(4), B30(2)	O41:H- ^a (5)	B30
O153:H7 (6)	B28(5), B30(1)	O2:NR ^b (3)	B29(1), B25(2)
NT ^c :H6 (5)	B24(1), B26(4)	O4:H1 (2)	B17
O110:H6 (4)	B30(2), B26(2)	O21:NR (2)	B19
O126:H- (2)	B28 (1), B30(1)	O20:H28 (1)	B30
O1:H45 (1)	B26	O128:NR (1)	B30
O126:H20 (1)	B28	NT:NR (62)	B28(11), B18(3), B19(3), B30(25), B24(2), B29(6), B16(4), B9(2), B31(3), B2(1), B17(2)
O145:NT ^d (1)	B31		
NT:H1 (1)	B30		

^a: Amostra imóvel.

^b: Teste não realizado.

^c: Não tipável com soros O utilizados.

^d: Não tipável com soros H utilizados.

Tabela 6. Relação dos sorotipos e biotipos em amostras de *E. coli eae+* isoladas de coelhos com e sem diarreia

Sorotipo	<i>Animais com diarreia</i>			<i>Animais sãos</i>		
	<i>Nº de amostras</i>		<i>Biotipo</i>	<i>Nº de amostras</i>		<i>Biotipo</i>
	<i>Total</i> (n=148)	<i>eae+</i> (n=74)		<i>Total</i> (n=30)	<i>eae+</i> (n=16)	
O132:H2	54	54	B28(5), B30(48), B24(1)	9	9	B30
O128:H2	5	5	B28(3), B30(2)	1	1	B28
O153:H7	2	2	B28(1), B30(1)	4	4	B28
O103:H19	12	0	B28	0	0	0
O41:H ^a	5	0	B30	0	0	0
NT ^b :H6	5	5	B24(1), B26(4)	0	0	0
O110:H6	4	4	B30(2), B26(2)	0	0	0
O2:NR	3	0	B29(1), B25(2)	0	0	0
O126:H-	2	2	B28(1), B30(1)	0	0	0
O20:H28	1	0	B30	0	0	0
O21:NR ^c	1	0	B19	1	0	B19
O126:H20	1	1	B28	0	0	0
O128:NR	1	0	B30	0	0	0
NT:H1	1	1	B30	0	0	0
O1:H45	0	0	0	1	1	B26
O4:H1	0	0	0	2	0	B17
O145:NT ^d	0	0	0	1	1	B31
NT:NR	51	0	B28(8), B18(3), B19(3), B30(20), B24(1), B29(6), B16(3), B9(1), B31(3), B2(1), B17(2)	11	0	B28(3), B30(5), B9(1), B16(1), B24(1)

^a: Amostra imóvel.

^b: Não tipável com soros O utilizados.

^c: Teste não realizado.

^d: Não tipável com soros H utilizados.

5.5. Inserção de LEE

O locus de inserção de LEE foi pesquisado nas 90 amostras *eae+*, sendo que 65 (72,2%) destas amostras, apresentaram o locus *pheU* interrompido e 11 amostras (12,2%) apresentaram inserção de LEE em *selC*. Em 14 delas (15,6%), não foi observada inserção de LEE nos dois loci acima descritos. A maioria das amostras que apresentou inserção de LEE em *pheU*, pertenceu ao sorotipo O132:H2, com exceção de duas amostras que pertenceram ao sorotipo O126:H-. Exemplos da eletroforese dos produtos de PCR para determinação da inserção de LEE em *pheU* e *selC* podem ser observados nas Figuras 3 e 4. A relação dos loci de inserção de LEE e sorotipos está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Relação entre locus de inserção de LEE e sorotipos encontrados em amostras de *E. coli* isoladas de coelhos

<i>Inserção em pheU</i>		<i>Inserção em selC</i>		<i>Inserção não determinada</i>	
<i>sorotipo</i>	<i>Nº amostras</i>	<i>sorotipo</i>	<i>Nº amostras</i>	<i>sorotipo</i>	<i>Nº amostras</i>
O132:H2	63	NT:H6	5	O128:H2	6
O126:H-	2	O110:H6	4	O153:H7	6
		O145:NT	1	O126:H20	1
		NT:H1	1	O1:H45	1
Total	65	Total	11	Total	14

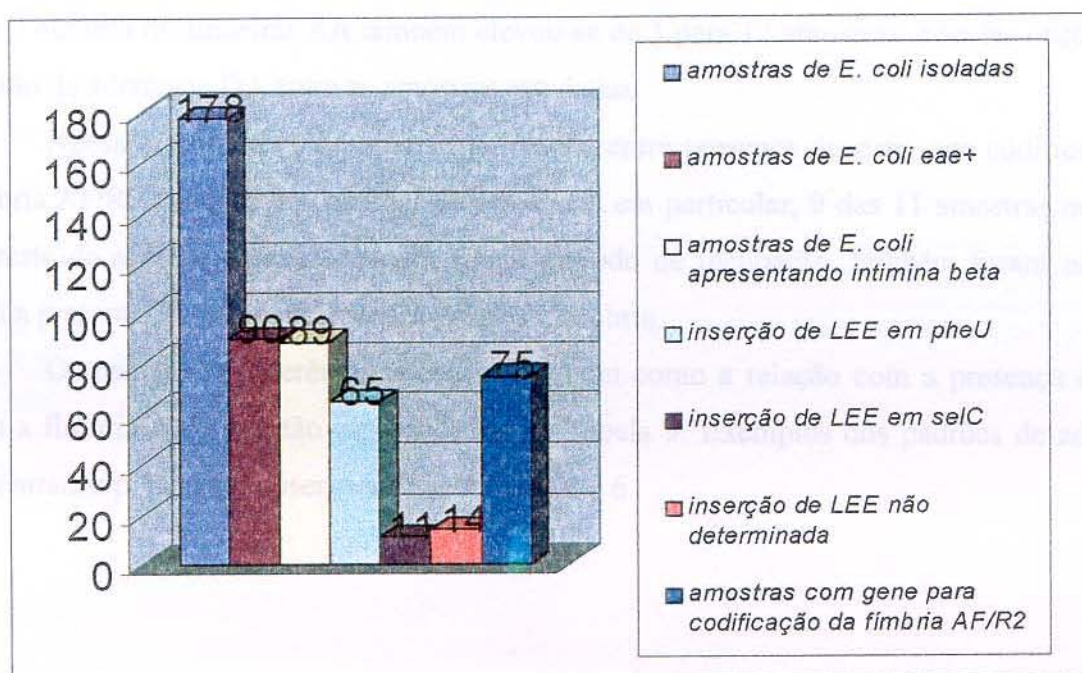
5.6. Fímbrias AF/R1 e AF/R2

A pesquisa, pela técnica de PCR dos genes *afrA* e *afr2* que codificam respectivamente para as fímbrias AF/R1 e AF/R2, foi realizada nas 90 amostras *eae+* e demonstrou que 75 (83,3%) destas amostras apresentaram o gene *afr2*. A sequência do gene *afrA* não foi identificada em nenhuma das amostras estudadas. A relação entre presença do gene *afr2* e sorotipos expressos por estas amostras está descrita na Tabela 8.

Tabela 8. Relação entre sorotipos e presença do gene *afr2* em amostras de *E. coli eae+* isoladas de coelhos

Sorotipos	Nº de amostras	Nº de amostras <i>afr2</i> +
O132:H2	63	61
O128:H2	6	5
O153:H7	6	6
NT:H6	5	0
O110:H6	4	0
O126:H-	2	2
O1:H45	1	1
O126:H20	1	0
O145:NT	1	0
NT:H1	1	0
Total	90	75

Gráfico 1. Representação do número de amostras de *E. coli* isoladas de coelhos, amostras *eae*+, amostras que apresentaram intimina β , amostras com inserção de LEE em *selC*, *pheU* e indeterminada e amostras *afr2*+



5.7. Pesquisa de toxinas, enterotoxinas e enterohemolisina.

A pesquisa dos genes que codificam enterotoxinas LT-I, LT-II, STa e STb, toxinas Stx1, Stx2, CNF1, CNF2 e enterohemolisina pela técnica de PCR identificou apenas uma amostra (169) como possuidora do gene que codifica a toxina CNF1. Esta amostra foi *eae*-, pertenceu ao sorogrupo O21 e biotipo 19 (Anexo). Outros genes que codificam as toxinas acima descritas não foram detectados entre as amostras de *E. coli* isoladas.

5.8. Teste de aderência em células HeLa

O teste de aderência, como especificado anteriormente, foi realizado somente com amostras *eae*+, empregando metodologia com período de 3 e 6h de incubação. Em ensaios realizados com período de incubação de 3h, obteve-se 20 amostras não aderentes e 59 não apresentaram nenhum padrão de aderência descrito, sendo classificadas como aderência Não Característica (NC). As demais amostras apresentaram os padrões LAL e AA. Foram, então realizados ensaios com período de incubação de 6h, os quais permitiram caracterizar amostras NC e obter aderência de amostras não aderentes no ensaio de 3h, as quais decaíram de 20 para 11 amostras. O número de amostras LAL passou de 6, no ensaio de 3h, para 46 no ensaio de 6h. O número de amostras AA também elevou-se de 5 para 12 amostras. Não foi observado o padrão de aderência DA entre as amostras estudadas.

Apesar de não ter sido observada relação entre presença do gene que codifica para a fimbria AF/R2 e algum dos padrões de aderência em particular, 9 das 11 amostras negativas no teste de aderência realizado com 6h no período de incubação, também foram negativas para a presença do gene que codifica para esta fimbria.

Os padrões de aderência encontrados, bem como a relação com a presença do gene para a fimbria AF/R2, estão especificados na Tabela 9. Exemplos dos padrões de aderência encontrados podem ser observados nas Figuras 5 e 6.

5.9. Teste de FAS (*Fluorescent Actin Staining*)

As amostras submetidas ao teste de FAS foram aquelas que apresentaram capacidade de aderência às células HeLa com período de 6h de incubação, independente do padrão de aderência que expressaram. Deste modo, 79 amostras de *E. coli* foram testadas, sendo que 52 foram positivas neste teste, representando 65,8% das amostras testadas. Curiosamente, amostras com aderência negativa com 3h de incubação e positiva com 6h, não foram capazes de causar polimerização da actina de células HeLa, sendo, portanto, FAS-. A grande maioria das amostras FAS+ também possuía o gene para fimbria AF/R2 (49), mas obteve-se 3 amostras positivas neste teste que foram negativas para presença do gene para AF/R2. A relação entre resultado positivo no teste de FAS e padrões de aderência encontrados, bem como presença do gene *afr2*, estão descritos na Tabela 9. Exemplo da reação positiva de FAS pode ser observado nas Figuras 7A e 7B.

Tabela 9. Padrões de aderência, teste de FAS e presença do gene *afr2* em amostras de *E. coli* isoladas de coelhos em testes de 3 e 6 horas

<i>Padrão de aderência observados</i>	<i>Período de incubação</i>		<i>Presença do gene</i>	<i>Amostras</i>
	<i>3h</i>	<i>6h</i>	<i>afr2+</i>	FAS+
LAL ^a	6	46	44	31
AA ^b	5	12	10	10
NC ^c	59	21	19	11
NA ^d	20	11	2	0
Total	90	90	75	52

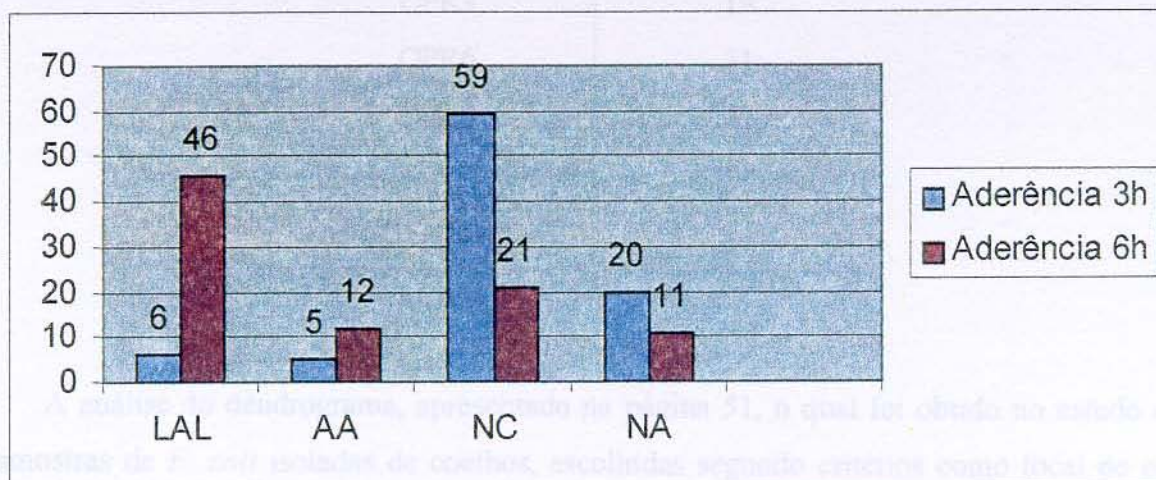
^a: Aderência “Localizada-Like” (5 amostras apresentaram aderência na lamínula semelhante ao padrão AA em ensaio de 6h).

^b: Aderência Agregativa.

^c: Aderência Não Característica.

^d: Não Aderente.

Gráfico 2. Número de amostras de *E. coli* observado em cada padrão de aderência obtido em testes empregando período de incubação de 3h e 6h



5.10. Microscopia eletrônica de transmissão

O exame em microscopia eletrônica de transmissão foi realizado com as amostras 7, 115, 136 e 189 (*eae*⁺ e *FAS*⁺) e demonstrou que todas foram capazes de causar formações típicas da lesão “attaching and effacing” nas células HeLa, conforme pode ser observado na Figura 8.

5.11. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

O teste de RAPD realizado neste estudo, empregou 4 iniciadores no ensaio de PCR: OPR 3, OPR 6, OPR 8, OPR 11 e o número de polimorfismos obtido com cada iniciador encontra-se descrito na Tabela 10.

Tabela 10. Número de polimorfismos dos iniciadores utilizados na técnica de RAPD

Iniciador	Polimorfismos
OPR3	19
OPR6	31
OPR8	27
OPR11	17
Total	94

A análise do dendrograma, apresentado na página 51, o qual foi obtido no estudo de 31 amostras de *E. coli* isoladas de coelhos, escolhidas segundo critérios como local de coleta, presença do gene *eae*, sorotipo e biotipo, chama a atenção pela diversidade genética entre as amostras, tanto quando se compara amostras de mesmo sorotipo e propriedades distintas quanto mesma propriedade e sorotipos distintos. O mesmo comportamento pode ser observado em relação aos biotipos. As amostras 246 e 169 formaram o “cluster” B a aproximadamente 20% de similaridade, totalmente distinto daqueles formados pelas demais amostras, o que implica na diversidade das mesmas, em relação às demais, apesar da amostra 246 possuir mesmo sorotipo e pertencer a propriedade comum a outras amostras estudadas. Pôde-se observar também, a formação do “cluster” A2b a aproximadamente 40% de similaridade entre as amostras isoladas na Europa (Espanha - R86, R120, R136, e Bélgica - RDEC-1). Este resultado indica variação genética entre as amostras isoladas na Europa daquelas isoladas no Estado de São Paulo, apesar das amostras das três origens conterem o gene *eae* e pertencerem aos mesmos sorogrupos (O103, O132 e O128). Outro dado a ser considerado é a formação de um outro “cluster” (A2a) desta vez com menor grau de similaridade (aproximadamente 30%) das amostras européias com amostras *eae*- e de sorogrupos não determinados, isoladas no estado de São Paulo, com exceção da amostra 7 (*eae*+, O126:H2). Este resultado distancia, geneticamente, ainda mais amostras patogênicas das duas origens.

Foram identificados dois pares de amostras idênticas: “cluster” A1a (amostras 109/126) e “cluster” A2c (amostras 178/203), sendo que amostras do mesmo par foram isoladas da mesma propriedade, são *eae*⁺ e apresentam o mesmo sorotipo.

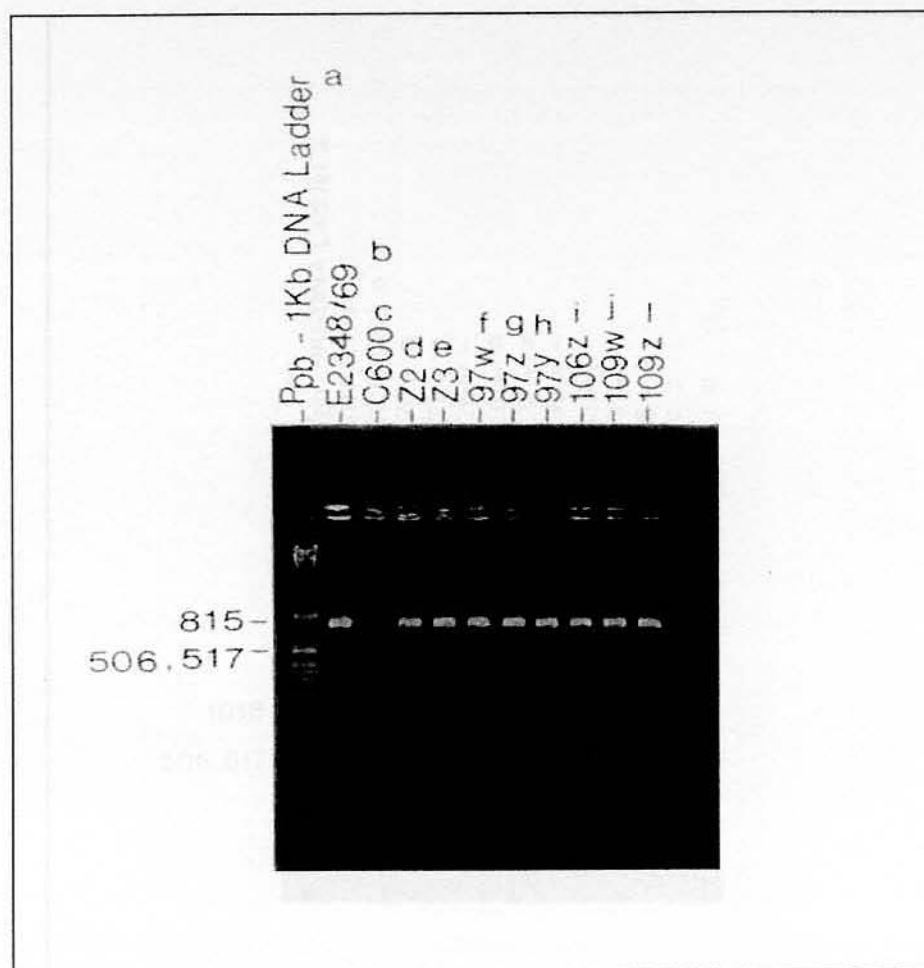


Figura 1. Detecção do gene *eae* em algumas amostras de *Escherichia coli* isoladas de coelhos pela técnica de PCR. Canaletas a, b e c, correspondem ao padrão de peso molecular, controles positivo para o gene *eae* e negativo para o gene *eae*, respectivamente. Canaletas d, e, f, g, h, i, j, l, correspondem a exemplos de amostras positivas para o gene *eae*

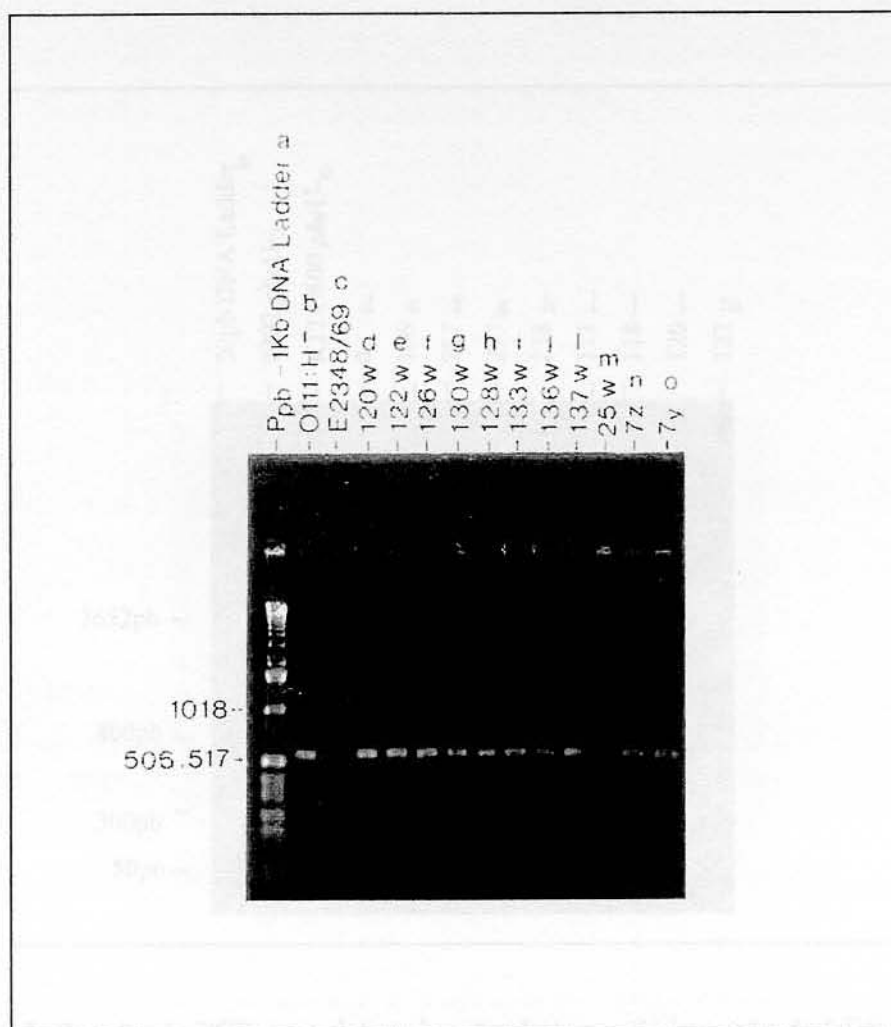


Figura 2. Detecção do subtipo β de intimina através da amplificação, pela técnica PCR, de fragmento da porção C-terminal do gene *eae* de algumas amostras de *Escherichia coli* isoladas de coelhos. Canaletas a, b e c, correspondem ao padrão de peso molecular, controles positivo para o intimina β e negativo para intimina β , respectivamente. Canaletas d, e, f, g, h, i, j, l, correspondem a exemplos de amostras positivas para intimina β . Canaleta m corresponde a única amostra *eae*⁺ que apresentou intimina não tipada

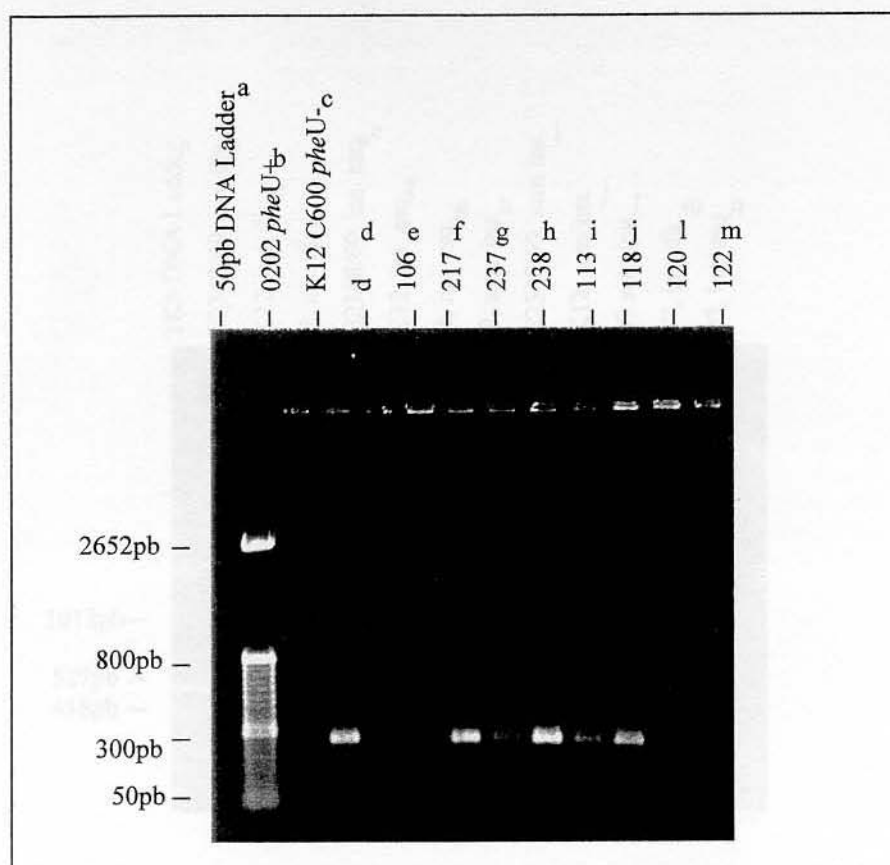


Figura 3. Reação de PCR para determinação do locus de inserção de LEE em *pheU* de algumas amostras de *Escherichia coli* isoladas de coelhos. Canaletas a, b e c correspondem respectivamente ao marcador de peso molecular, controle positivo e controle negativo para inserção de LEE em *pheU*. Canaletas d, e, l, m, correspondem a amostras positivas para inserção de LEE em *pheU*. Canaletas f, g, h, i, j, correspondem a amostras negativas para inserção de LEE em *pheU*.

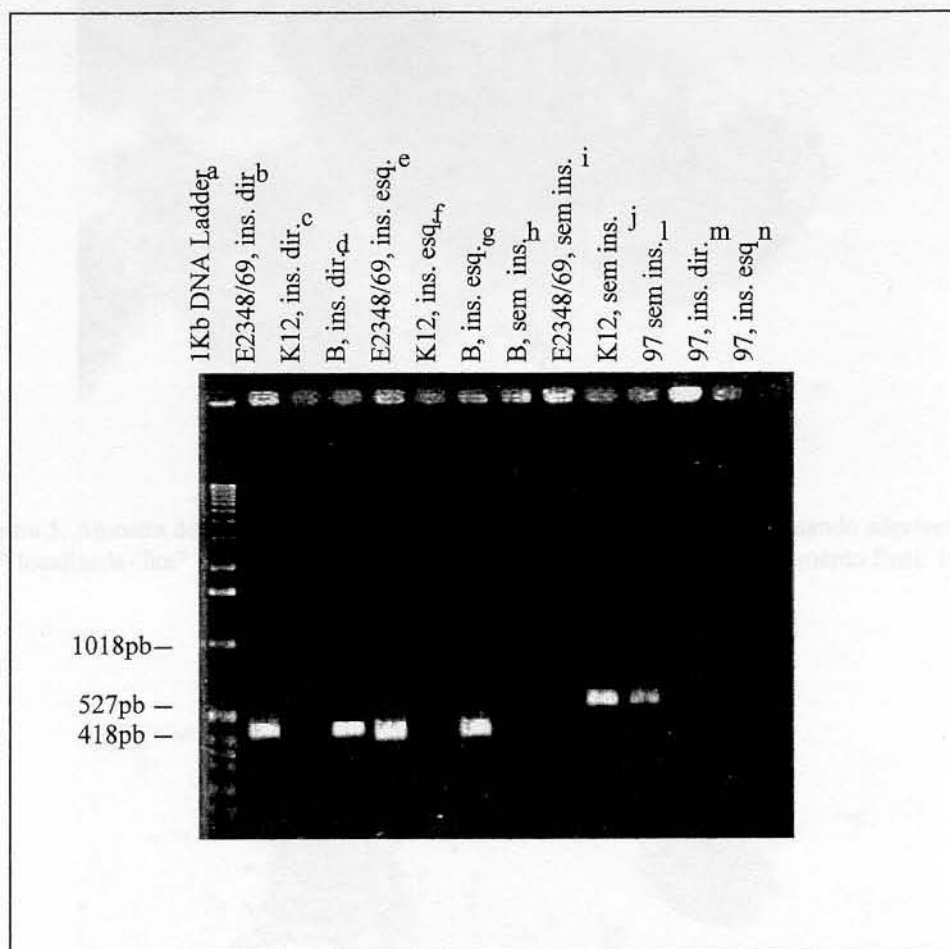


Figura 4. Resultados do teste de PCR para amplificação das regiões de inserção de LEE em *selC* de duas amostras de *Escherichia coli* isoladas de coelhos. **a**: Marcador de peso molecular. **b**: Controle positivo para inserção à direita de LEE em *selC*. **c**: Controle negativo para inserção à direita de LEE em *selC*. **d**: Amostra B1 demonstrando inserção à direita de LEE em *selC*. **e**: Controle positivo para inserção à esquerda de LEE em *selC*. **f**: Controle negativo para inserção à esquerda de LEE em *selC*. **g**: Amostra B1 demonstrando inserção à esquerda de LEE em *selC*. **h**: Amostra B1 demonstrando incapacidade de amplificar fragmento do locus para codificação de *selC* intacto. **i**: Controle negativo para amplificação de *selC* intacto. **j**: Controle positivo para amplificação de *selC* intacto. **k**: Amostra 97w demonstrando amplificação de *selC* intacto. **m**, **n**: Amostra 97w demonstrando ausência de inserção de LEE respectivamente à direita e esquerda em *selC*.

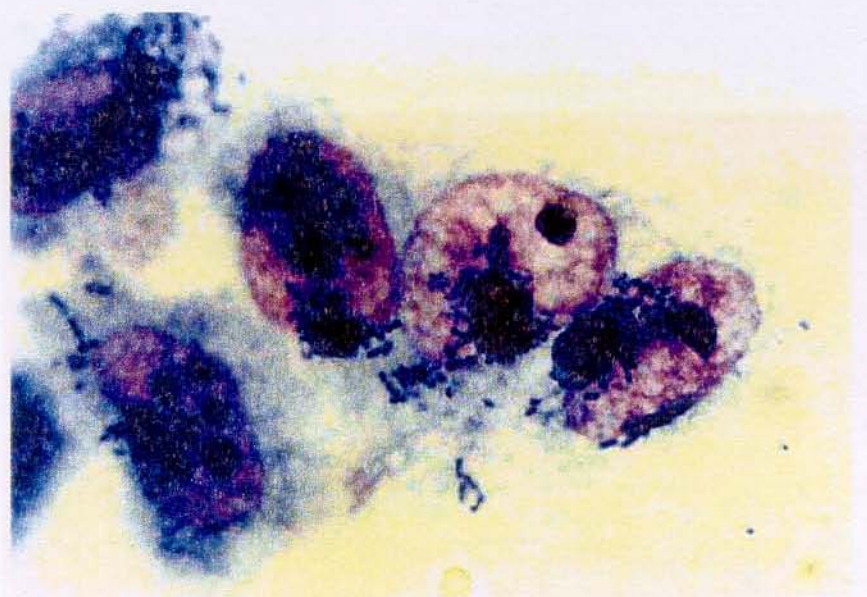


Figura 5. Amostra de *Escherichia coli* isolada de coelho (amostra 7) apresentando aderência LAL (“localizada-like”) com período de incubação de 6h em células HeLa. Aumento final: 1000x.

Figura 5A. Amostra de *Escherichia coli* isolada de coelho (amostra 7) apresentando aderência LAL, com período de incubação de 6h, observada em campo de luz.

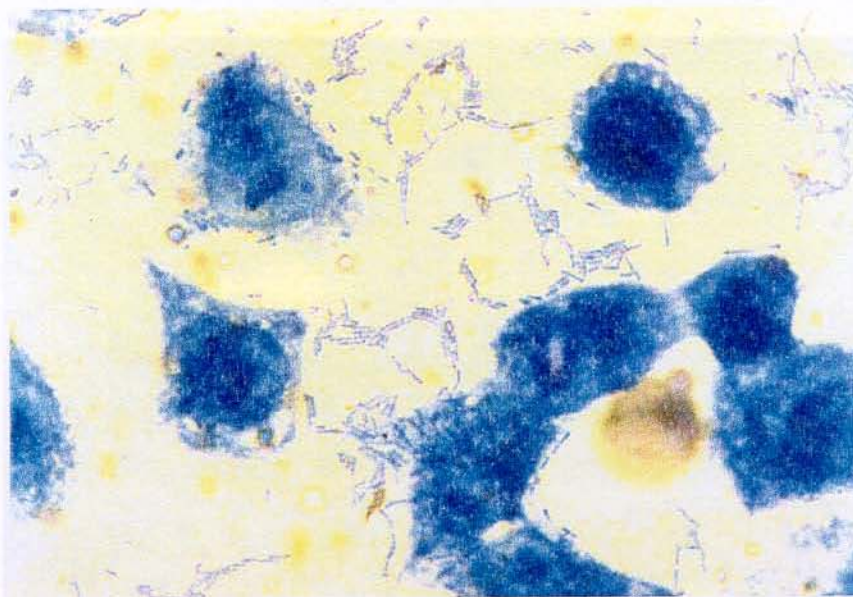


Figura 6. Amostra de *Escherichia coli* isolada de coelho (amostra 200) apresentando aderência AA (Agregativa), com período de incubação de 6h em células HeLa. Aumento final: 1000x

Figura 6A. Amostra de *Escherichia coli* isolada de coelho (amostra 200) apresentando aderência AA, com período de incubação de 6h, observada em campo de luz.

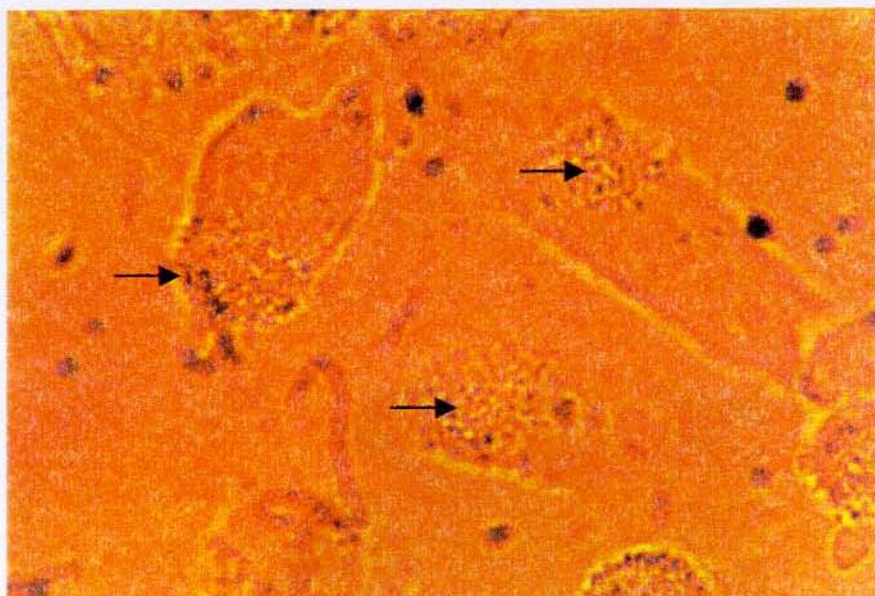


Figura 7A. Amostra de *Escherichia coli* isolada de coelho (amostra 130) apresentando aderência LAL, com período de incubação de 6h, observada sob contraste de fase

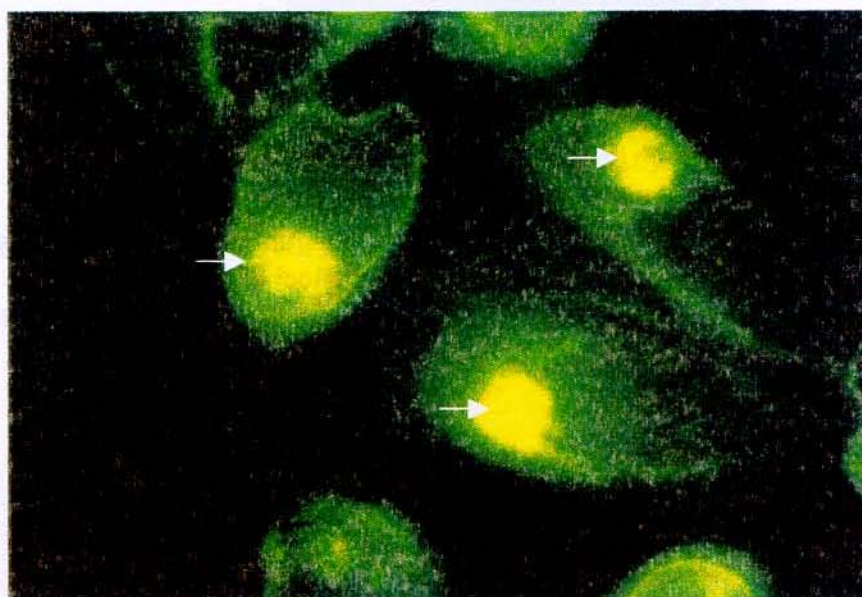


Figura 7B: Amostra de *Escherichia coli* isolada de coelho (amostra 130) apresentando reação de FAS positiva em células HeLa, com período de incubação de 6h

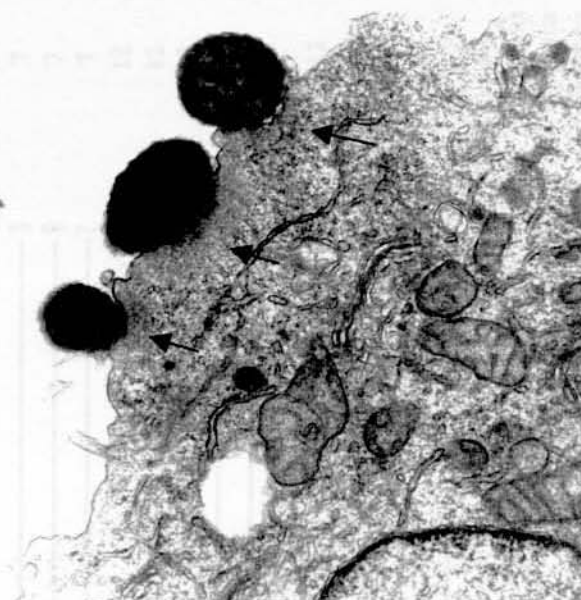
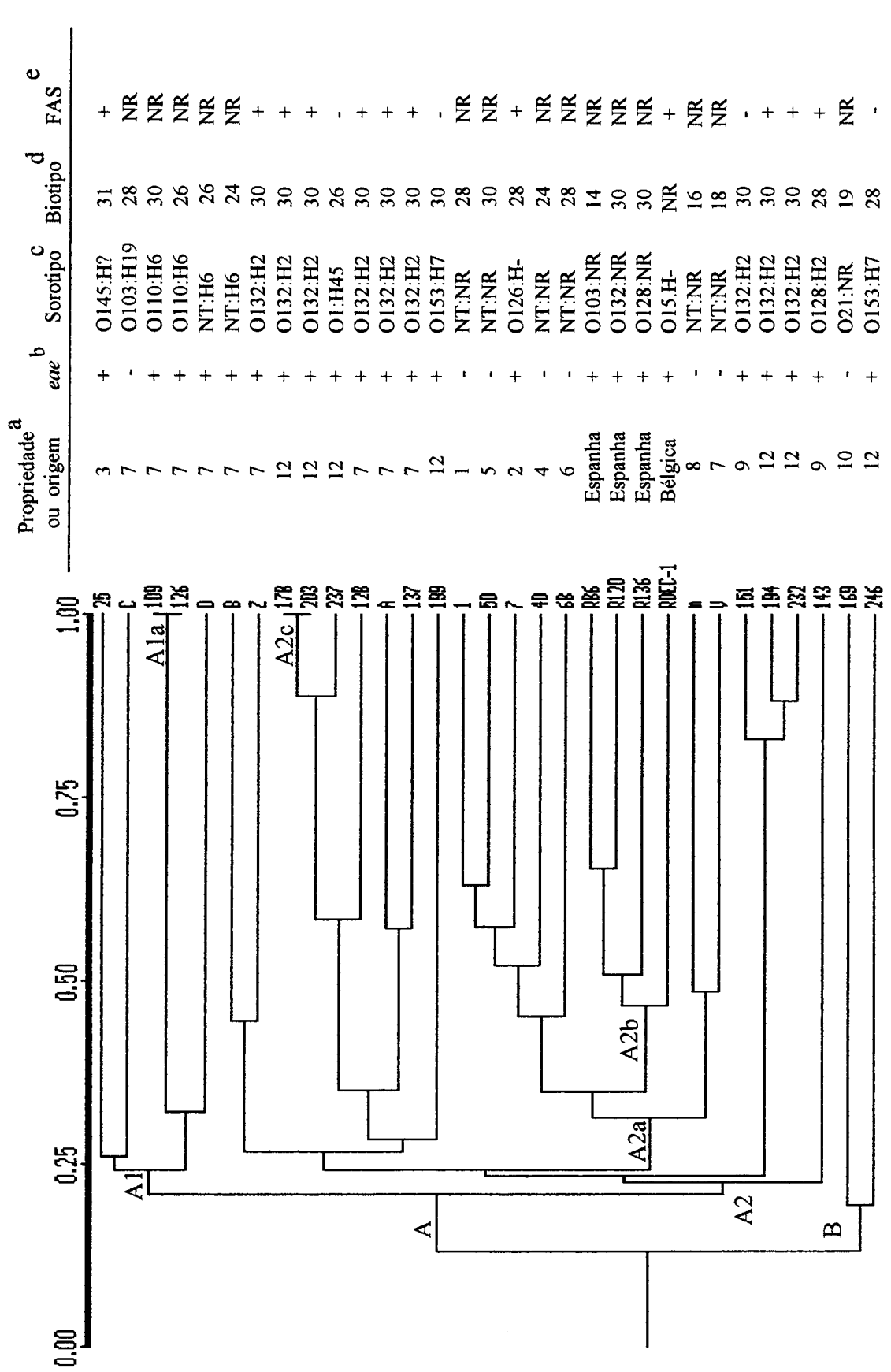


Figura 8. Lesão “attaching and effacing” em célula HeLa provocada pela amostra *E. coli* 189 isolada de coelho. Setas indicam regiões mais eletrondensas, sugerindo polimerização de actina. Aumento final 21.900x

Dendrograma



- a: Denominação da propriedade onde a amostra fecal da qual a amostra de *E.coli* foi isolada, ou local de origem das amostras européias incluídas no teste de RAPD.
- b: Presença (+) ou ausência (-) do gene *eae* na amostra de *E. coli* em estudo.
- c: Sorotipo ou sorogrupo da amostra de *E. coli* em estudo.
- d: Biotipo da amostra de *E. coli* em estudo.
- e: Reação positiva (+) ou negativa (-) no teste de FAS da amostra de *E. coli* em estudo.

6. DISCUSSÃO

Entre as principais causas de diarreia em coelhos, a infecção por *Escherichia coli* tem despontado como causa freqüente desta patogenia, sendo que a maioria das pesquisas com colibacilos nesta espécie animal foram, até o momento, realizadas em países europeus, como França, Bélgica, Holanda e Espanha (Prescott, 1978; Peeters *et al.*, 1984a; Camguilhem e Milon, 1989; Blanco *et al.*, 1997a). Entretanto, no Brasil, apesar da cunicultura se apresentar de forma modesta quando comparada aos países anteriormente citados, começa a apresentar sinais de desenvolvimento, visando atender não só ao mercado interno de consumo de carne e pele, mas também a exportações de produtos e subprodutos.

O rebanho de coelhos no Estado de São Paulo sofre com a diarreia que, apesar de mais branda e menos freqüente que a observada em países europeus, também traz grande prejuízo ao produtor pois, apesar de se obter a recuperação do animal em grande parte dos casos (dados não apresentados), a diarreia causa perda de peso e conseqüente atraso no prazo de abate ou venda dos animais infectados, o que implica em mais gastos com alimentação e medicamentos (Waldyr Giorgi, Instituto Biológico de São Paulo, comunicação pessoal). Tais relatos justificaram, portanto, a pesquisa da presença da bactéria *Escherichia coli* em fezes de coelhos de criações do Estado de São Paulo, bem como a caracterização destas amostras e pesquisa de fatores de virulência próprios de amostras AEEC, pois esta classe de colibacilos patogênicos é responsável por 25 a 40% dos casos de diarreia em coelhos, como verificado por pesquisas desenvolvidas com este microrganismo em criações européias (Peeters, 1993; Blanco *et al.*, 1993b).

De fato o estudo de amostras de *Escherichia coli* isoladas de coelhos de criações brasileiras revelou a presença do gene *eae* em 50,6% das 178 amostras estudadas. O gene *eae* codifica a proteína intimina que é responsável pela aderência íntima entre bactéria e células eucarióticas, a partir da qual se desencadeia o processo de formação da lesão A/E. Assim a sua pesquisa tem orientado o estudo de amostras AEEC isoladas tanto de humanos como de animais, podendo ser considerado um marcador de virulência de amostras AEEC (Nataro, 1996a; Leroy *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1994; Blanco *et al.*, 1996a; China *et al.*, 1999). Assim, a

detecção deste gene nas amostras de *E. coli* estudadas neste trabalho indica um potencial patogênico apresentado pelas mesmas. Ainda em relação ao gene *eae*, outro fato que pode ser notado é referente à semelhança de porcentagens de amostras *eae*⁺ entre fezes diarreicas (50,0%) e normais (53,3%). A explicação para este fato, talvez possa estar baseada na predominância de amostras *eae*⁺ pertencentes ao sorotipo O132:H2 em animais doentes e sadios. Este sorotipo está relacionado a diarreias brandas, quando comparada a diarreia causada por sorotipos mais virulentos como O15:H- e O103:H2 (Blanco *et al.*, 1997a). Deste modo, como na maioria dos casos a doença não evolui para óbito, o restabelecimento do animal seria possível, assim como a capacidade deste em se tornar portador sadio de amostras *eae*⁺. Embora a cinética da colibacilose em coelhos ainda não ter sido estudada e, portanto, desconhecer-se quanto tempo animais convalescentes da infecção por AEEC ficariam eliminando a bactéria nas fezes, seria viável a suposição de que as amostras *eae*⁺ isoladas de fezes não diarreicas poderiam ser, na verdade, remanescentes de infecção anterior. Resultados semelhantes têm sido encontrados em amostras controle de fezes de crianças de até 1 ano de idade, estudadas quanto aos fatores de virulência de amostras EPEC e/ou AEPEC (L. R. Trabulsi, Instituto Butantã - comunicação pessoal) isto é, em estudos muito bem conduzidos pelo grupo deste autor e seus colaboradores, têm sido encontradas, em fezes de crianças normais, amostras de *E. coli eae*⁺.

A descrição da intimina β em todas as amostras *eae*⁺, com exceção de uma, era de certa forma esperada, uma vez que trabalhos com amostras de *E. coli* isoladas de coelhos o têm descrito, como o único subtipo encontrado em amostras *eae*⁺ até o momento (Agin e Wolf, 1997; Adu-Bobbie *et al.*, 1998). A possibilidade de produção de uma vacina geneticamente elaborada, utilizando a porção C-terminal da intimina é bastante atrativa, uma vez que esta porção da proteína é altamente imunogênica. No entanto, a diversidade desta porção não conservada parece ser guiada pela seleção natural refletindo, portanto, na adaptação da bactéria frente à produção de anticorpos específicos (Adu-Bobbie *et al.*, 1998). Desta forma uma vacina que conferisse proteção a uma determinada intimina, falharia quando desafiada por uma nova intimina. No caso de coelhos, esta situação pode se apresentar um pouco diferente, uma vez que, até o momento, a intimina β foi a única descrita. Talvez a

produção de uma vacina contra este subtipo de intimina fosse recomendada na proteção de coelhos contra amostras REPEC.

Esta predominância do subtipo β , bastante evidente nas amostras *eae+* isoladas de coelhos no Brasil, difere bastante de estudos de amostras de AEEC isoladas de outros animais, tais como bovinos, cães e sagüis (Pestana de Castro A.F., ICB-II, USP, São Paulo - comunicação pessoal). Resumidamente, em bovinos foram encontrados os subtipos de intimina β , γ e ε e um número considerável de 30 amostras, entre cerca de 55 estudadas, com subtipos de intiminas não tipáveis. Resultados semelhantes em termos proporcionais foram achados para amostras de AEEC isoladas de cães e sagüis (dados não publicados). Por outro lado, a existência nas amostras de coelhos de uma amostra que não teve intimina subtipada, sugere a possibilidade, embora rara (1,1%), de um novo subtipo, diferente dos já descritos na literatura (α , β , δ , γ e ε).

O exame do locus de inserção de LEE não apresentou homogeneidade entre as amostras estudadas. Apesar da maioria apresentar inserção de LEE em *pheU* (72,2%) também foi observada inserção em *selC* (12,2%) e, em 15,6% das amostras, o locus de inserção de LEE não foi determinado, sugerindo sua inserção em uma ou mais regiões ainda não descritas. Entretanto, quando se relacionou locus de inserção de LEE e sorotipos, verificou-se que em todas amostras pertencentes ao sorotipo O132:H2, LEE estava inserindo em *pheU*, e que, com exceção das duas amostras do sorotipo O126:H-, que também apresentaram inserção de LEE neste mesmo locus, todos os demais sorotipos identificados em amostras *eae+* apresentaram inserção de LEE em outro locus (*selC* ou outra região). Este dado contribui na definição do perfil de amostras REPEC no estado de São Paulo. Na verdade, pouco se sabe a respeito do comportamento desta classe de amostras quanto ao locus de inserção de LEE. Zhu *et al.*, (2001), realizaram o seqüenciamento de nucleotídeos de LEE da amostra RDEC-1, protótipo de amostra REPEC, e estabeleceram regiões de maior e menor homologia com amostras EPEC e EHEC. No entanto, não se aprofundaram no estudo sobre o locus de inserção desta ilha de patogenicidade, afirmando apenas que, naquela amostra, LEE não se inseria em *selC*.

A sorotipagem das amostras *eae+* não identificou nenhum sorotipo relacionado à diarreia severa em coelhos como ocorre em países da Europa, ou sejam, O15:H-; O103:H2 e O26:H11 (Peeters *et al.*, 1984a, b, 1988). No entanto, o sorotipo O132:H2 foi encontrado em

70,0% das amostras *eae+*, não tendo sido identificadas amostras *eae-* com este sorotipo. O sorotipo O132:H2, assim como os sorotipos O128:H2 e O153:H7, também identificados neste estudo, quando colonizam o intestino de coelhos, causam diarreia menos severa se comparados aos sorotipos mais virulentos e, normalmente não provocam desidratação grave, sendo mais raro evoluírem para óbito. Porém, levam a retardo no crescimento dos animais infectados (Varga e Pesti, 1982; Peeters *et al.*, 1988; Camguilhen e Milon, 1989). A sobrevivência do animal no caso de infecção por estes sorotipos de patogenia branda, pode explicar, como comentado anteriormente, a recuperação de amostras *eae+* de animais sãos.

Em estudos realizados por Trabulsi *et al.*, (2001) existe a formulação da hipótese de animais serem o principal reservatório de amostras EPEC atípicas. Em nosso estudo, foram identificadas 6 amostras do sorotipo O128:H2 que também foram *eae+*, perfil que enquadra estas amostras no grupo das EPEC atípicas. Deste modo, esta pesquisa contribuiu para elucidar mais um reservatório em potencial de amostras EPEC atípicas.

Outra constatação observada foi a identificação de 12 amostras, todas *eae-* pertencentes ao sorotipo O103:H19. O sorogrupo O103 é isolado com frequência de diarreia severa em coelhos da Espanha e França, mas sempre associado ao antígeno H2. Varga e Pesti (1982), ao conduzirem um experimento que constou da administração oral de amostras O103:H19, utilizando carbonato de sódio como tamponante para verificação da influência do pH no desenvolvimento de diarreia por colibacilos em coelhos, observaram que 4 de 5 animais infectados desenvolveram diarreia, e 2 destes evoluíram para óbito. No entanto, a presença de fatores de virulência típicos de amostras AEEC não foi verificada, uma vez que na época de realização do trabalho, desconhecia-se quais os mecanismos de virulência comuns em colibacilos diarreio gênicos para coelhos.

As amostras que não tiveram seu sorogrupo definido (NT- não tipável), com exceção de 7 amostras, foram todas *eae-* (70,5%). Todas as 178 amostras foram inicialmente testadas com um “Kit” de anti-soros contra os antígenos O mais comuns em amostras de *E. coli* isoladas de coelhos. Posteriormente, as amostras *eae+* e apenas algumas *eae-* foram enviadas ao Laboratório de Referência de *E. coli* (LREC) (Lugo, Espanha) para confirmação dos sorogrupos ou identificação dos mesmos, no caso de amostras NT, e lá foram testadas com anti-soros contra todos os antígenos O descritos. Talvez as demais amostras NT poderiam ter

o sorogrupo definido se também fossem testadas com anti-soros de O1 a O181. De qualquer forma, amostras potencialmente patogênicas, ou seja, contendo o gene *eae*, tiveram os sorotipos definidos, sobressaindo-se portanto, o sorotipo O132:H2, já citado como o mais comum entre amostras com este fator de virulência.

Quanto à pesquisa dos biotipos expressos por amostras de *E. coli* isoladas de coelhos no Estado de São Paulo, observou-se que o biotipo 30 é predominante (53,9%), sendo que a frequência do biotipo 28 também foi expressiva (21,9%). O biotipo 30 demonstrou estar relacionado ao sorotipo O132:H2, correspondendo a 90,5% do total deste sorotipo. Nossos dados se assemelham, em parte aos descritos por Blanco *et al.*, (1997d), que relataram que a maioria das amostras de sorotipo O132:H2 também pertencia ao biotipo 30. Nesta mesma publicação, estes autores afirmaram que a biotipagem é uma metodologia muito útil no caso de identificação de amostras patogênicas, pois obtém-se boa correlação de biotipos B6, B12 e B14 com sorogrupo O103, B13 com O26, B16 com O159, B20, com O103, B27 com O2 e B28 com O153. Nestes casos, a biotipagem seria um achado presuntivo na identificação de amostras patogênicas, principalmente em relação aos sorotipos O26 e O103, mas que nos demais casos, como o biotipo 30, seria necessária a confirmação com a sorotipagem. Tal fato também pode ser observado neste estudo, uma vez que não se obteve correlação do biotipo 30 ou de qualquer biotipo identificado, com algum sorotipo em particular.

De qualquer forma, somando-se os resultados de presença do gene *eae*, sorotipagem e biotipagem, foi possível definir o sorobiotipo O132:H2:B30 como predominante entre isolados *eae*⁺ (63,3%), definindo o perfil de amostras potencialmente patogênicas para coelhos no Estado de São Paulo.

A ausência de genes que codificam para toxinas e enterotoxinas, além de enterohemolisina, nas amostras estudadas era esperada, uma vez que pesquisas destes fatores de virulência já realizadas com amostras diarreiogênicas de mesma origem, porém em outros países, também não apontaram a produção de toxinas como fator relevante na causa de diarreia em coelhos (Blanco *et al.*, 1994, Blanco *et al.*, 1996a). Foi detectado o gene que codifica para a toxina CNF1 em uma única amostra (169) entre as 178 estudadas. A toxina CNF1, assim como CNF2, é produzida por amostras de *E. coli* isoladas de crianças e animais com diarreia e de septicemia e infecções urinárias em humanos. Causa necrose em pele de

coelhos e impede a divisão celular, provocando o aparecimento de células gigantes multinucleadas em várias linhagens celulares (Blanco *et al.*, 1993a). A ocorrência do gene que codifica a toxina CNF1 deve ser mencionada, mas certamente não tem um papel relevante na diarreia apresentada pelo animal cuja amostra foi isolada.

O teste de aderência em células HeLa demonstrou que o período de incubação de 6h das células com as amostras bacterianas foi o ideal na pesquisa da aderência de amostras de *E. coli* isoladas de coelhos, pois 38 amostras que foram NC em ensaios de 3h, assumiram padrão de aderência em ensaio de 6h. Algumas amostras NA em ensaios de 3h tornaram-se aderentes em período de 6h. No entanto, a definição do padrão de amostras NC foi o efeito mais importante observado em ensaio de 6h. Considerando o teste realizado com 6h de incubação, o padrão de aderência LAL (“Localizada-like”) foi expresso pela maioria das amostras (46 amostras) sendo também encontrado o padrão AA (Agregativa), além de 21 amostras NC e 11 amostras não aderentes.

Relatos sobre padrões de aderência de amostras de coelhos são controversos e estão restritos a poucos sorotipos. Cantey e Moseley (1991), utilizando a amostra RDEC-1 (O15:H-), além de amostra EHEC no estudo de aderência de amostras AEEC, verificaram que a amostra RDEC-1 apresentava aderência quase nula em culturas de células. Milon *et al.*, 1990, ao descreverem a proteína de 32kDa, que posteriormente demonstrou ser parte integrante da fimbria AF/R2 (Fiederling *et al.*, 1997), relataram que esta conferia à amostras *eae+* do sorogrupo O103, a capacidade de aderirem de maneira difusa às células HeLa. No entanto, Robins-Browne *et al.*, (1994), estudando amostras que causavam “attaching and effacing” em coelhos, verificaram que o padrão de aderência destas amostras às células HEp-2 variava consideravelmente, sendo encontrados os padrões LA, DA e aderência mista LA/DA, além de amostras não aderentes, sendo que nenhuma delas hibridizou com sondas que reconhecessem os genes responsáveis por estes padrões de aderência em amostras de *E. coli* diarreiogênicas de origem humana. Amostras do sorotipo O103:H2 apresentaram aderência mista (LA/DA). Uma amostra O128:H2 apresentou o padrão LA e uma amostra O15:H- apresentou o padrão DA, sendo que esta não apresentou a presença de fimbrias na sua superfície.

De fato, ainda não foi estabelecido qual ou quais adesinas estão envolvidas na colonização do epitélio intestinal de coelhos por amostras REPEC. Na literatura, as adesinas

descritas até o momento são: a fimbria AF/R1, descrita na amostra REDEC-1 (O'Hanley e Cantey, 1985), a fimbria Ra1, descrita nesta mesma amostra, que parece agir em cooperação com a intimina na colonização do epitélio (Krejany *et al.*, 2000), e a fimbria AF/R2 em amostras do sorotipo O103:H2 não fermentadoras do carboidrato ramnose (Fiederling *et al.*, 1997), além de um plasmídeo de 117Kb, descrito em amostras do sorogrupo O103, que além de carregar genes para resistência a antibióticos, também possui genes que contribuem na colonização intestinal de coelhos (Licois *et al.*, 1991). Como pode ser observado, apenas no estudo de dois sorotipos, ou sejam, O15:H- e O103:H2, foram descritos quatro fatores distintos de colonização, mas nenhum deles podem ser claramente relacionado ao padrão de aderência específico da bactéria à célula hospedeira.

Analizados em conjunto, estes resultados sugerem que a aderência inicial de amostras REPEC a células eucarióticas provavelmente envolvem diversos mecanismos e que estes podem variar de amostra para amostra, uma vez que não se observa um padrão homogêneo de aderência entre elas. Esta variação não é restrita a amostras de *E. coli* de coelhos, pois também é verificada em colibacilos isolados de outros animais como suínos (Penteado *et al.*, 2001), bovinos (Aidar *et al.*, 2000), cães (Gerson Nakazato, IB, UNICAMP - comunicação pessoal) e primatas (Vania Maria de Carvalho, ICB-II, USP, São Paulo - comunicação pessoal).

As definições dos padrões de aderência conhecidos (LA, DA, AA, LAL e NC) surgiram do estudo de amostras de *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) para humanos (Nataro *et al.*, 1985; Scaletsky *et al.*, 1988) e têm se prestado na caracterização de amostras desta origem, sendo alta a correlação entre fatores de virulência e presença de adesinas que produzem padrões específicos de aderência (Scaletsky *et al.*, 1996). Entretanto, Vieira *et al.*, (2001), identificaram em amostras EPEC atípicas isoladas de humanos, padrões de aderência AA e DA, que não hibridizaram com sondas para a pesquisa dos genes responsáveis pelas adesinas que promovem estes padrões de aderência. Este é mais um indício de que a aderência inicial da bactéria à célula eucariótica no processo de formação da lesão “attaching and effacing” pode empregar mecanismos diferentes entre as diversas amostras bacterianas, até mesmo entre amostras EPEC atípicas.

Ainda em relação à aderência bacteriana em células de linhagem, o teste de determinação do padrão da mesma foi desenvolvido para proporcionar um diagnóstico rápido, em conjunto com a sorogrupagem na identificação de amostras EPEC (A/E+), uma vez que amostras isoladas de casos de diarreia por amostras humanas de EPEC aderiam às células HEp-2, enquanto amostras não patogênicas raramente o faziam (Mathewson e Cravioto, 1989).

A descoberta de que amostras A/E+ eram capazes de causar lesões “attaching and effacing” também em células de linhagem proporcionou a Knutton *et al.* (1989) desenvolverem a técnica de “Fluorescent Actin Staining” (FAS), baseada na coloração com faloidina marcada com fluoresceína de agregados de actina do citoesqueleto, polimerizada no ponto de aderência da bactéria à célula eucariótica, possibilitando, assim a visualização do fenótipo “attaching and effacing” de modo mais simples que a observação da lesão em microscopia eletrônica. Assim, este teste é atualmente utilizado no diagnóstico de amostras A/E+ e, conseqüentemente, de amostras EPEC, sendo que células HeLa também podem ser utilizadas neste teste, proporcionando resultados indistintos dos de células HEp-2 (Silva *et al.*, 1989). O teste FAS foi utilizado neste trabalho na identificação de amostras de *E. coli* que apresentavam o fenótipo “attaching and effacing”. As amostras escolhidas para este teste, foram aquelas que apresentaram o gene *eae* e demonstraram capacidade de aderência às células HeLa, indistintamente do padrão, sendo que até mesmo amostras de aderência NC, desde que apresentassem-na em quantidade aparentemente satisfatória foram também testadas. Observou-se que 65,8% das amostras examinadas foram FAS+ ou A/E+, indicando que estas amostras têm potencial para desenvolver o mesmo fenótipo “in vivo”. Este teste foi realizado com o período de 6h de incubação das células com a bactéria. Esta metodologia foi empregada porque melhores resultados no teste aderência foram obtidos com este período de tempo. Levando em consideração que a presença da fimbria AF/R2 não é essencial na formação da lesão A/E, e também a hipótese de outras adesinas estarem envolvidas neste processo, uma vez que obtivemos padrões de aderência diferentes (LAL, AA) em amostras FAS+, podemos afirmar que nossos dados estão de acordo com os resultados publicados por Knutton *et al.* (1991), que recomendam o teste de 6h no estudo de amostras EPEC atípicas pois, nestas amostras, o Bfp não está presente e, portanto, o processo de formação da lesão

A/E, que empregaria outra(s) adesina(s) possivelmente requerendo um período de tempo maior para a formação da lesão do que amostras que contam com esta fimbria nos primeiros estágios de formação da lesão (Pelayo *et al.*, 1999). Diante destes resultados, pode-se afirmar, portanto, que não existe correlação entre padrão de aderência expresso por amostras de *E. coli* isoladas de coelhos e capacidade de causar lesão A/E.

Uma ressalva deve ser feita em relação às amostras que apresentaram aderência agregativa e foram FAS+. Relatos de estudos realizados com colibacilos AA de origem humana, afirmam que estes não são capazes de causar polimerização de actina de células eucarióticas (Hicks *et al.*, 1996, Nataro *et al.*, 1996c). No entanto, já foram descritas amostras de aderência DA que são capazes de provocar polimerização da actina, o que prova que não apenas amostras que formam “clusters” na célula hospedeira (LA, LAL) podem ser FAS+ (Beinke *et al.*, 1998). De qualquer modo, futuras investigações que comprovem o potencial em causar lesão A/E, como a observação em microscopia eletrônica de transmissão, devem ser feitas com as amostras AA+/FAS+ descritas neste trabalho.

O gene que codifica a fimbria AF/R2 foi encontrado em 75 (83,3%) das 90 amostras *eae+* estudadas. Este gene está presente na maioria das amostras O103:K-:H2 ramnose negativas que são a principal causa de diarreia severa em criações de coelhos na França (Milon *et al.*, 1990). Esta fimbria não é encontrada em amostras avirulentas deste mesmo sorotipo, mas é expressa em amostras do sorogrupo O128 que são, via de regra, moderadamente virulentas (Milon *et al.*, 1990). Levando-se em conta que este sorotipo foi encontrado em 5 amostras *eae+* provenientes de fezes diarreicas, existe a possibilidade de no Brasil, o sorotipo O128:H2 ser enquadrado pelo menos, como moderadamente virulento. Para o fato deste sorotipo ter sido encontrado em uma amostra *eae+*, mas proveniente de fezes normais, valem os mesmos comentários já feitos para o sorotipo O132:H2, isto é, o animal em questão pode ter tido diarreia e se tornado portador.

Neste estudo, a grande parte das amostras classificadas como pertencentes ao sorotipo O132:H2, predominante na coleção estudada, apresentou genes que codificam para a fimbria AF/R2. Este resultado indica, provavelmente, que esta adesina deve desempenhar um papel importante na etiopatogenia das diarreias em coelhos no Estado de São Paulo.

Uma observação a ser feita, é que amostras AF/R2+ expressaram diferentes padrões de aderência, isto é, foram encontradas amostras apresentando aderência LAL, AA e NC, sendo inclusive encontrada aderência em amostras AF/R2-. Isto talvez indique, como comentado anteriormente, que a aderência primária da bactéria à célula eucariótica seja determinada por múltiplos fatores, que não só a fimbria AF/R2. Comportamento semelhante é encontrado em amostras que expressam a fimbria AF/R1, pois sabe-se através do estudo da amostra RDEC-1, que ela é capaz de causar diarreia em coelhos. No entanto, um mutante desta amostra, desprovida de AF/R1, ainda é capaz de produzir diarreia, porém em menor grau em animais inoculados experimentalmente (Cantey *et al.*, 1989). O mesmo raciocínio poderia se aplicar em relação ao teste de FAS, onde 3 amostras positivas neste teste, portanto capazes de causar lesão A/E, não apresentaram genes para produção da fimbria AF/R2.

A comprovação da capacidade de quatro de nossas amostras (7, 115, 136 e 189) em causar lesão “attaching and effacing” em células HeLa através da observação da lesão em microscópio eletrônico, veio confirmar o potencial de virulência das amostras de *E. coli* isoladas de coelhos. Infelizmente foi inviável a realização deste teste com todas as amostras *eae*+ / FAS+, mas assegura, sem dúvida a confiabilidade do teste de FAS+ na habilidade de causar lesão A/E em células de cultura, modelo biológico na pesquisa desta característica de virulência em amostras AEEC.

A análise do dendrograma obtido através da técnica de RAPD, demonstrou que esta técnica não foi suficiente para agrupar os diferentes fenótipos apresentados pelas amostras analisadas. Este resultado sugere que estas amostras não sofreram pressão de seleção suficiente para poder se distanciar geneticamente uma das outras. De fato, com exceção de uma, as demais granjas localizam-se em regiões próximas (dados não mostrados), facilitando o contato entre animais das diferentes propriedades. Somando-se a esta afirmação, pode-se observar que apesar da cunicultura em São Paulo estar em expansão, conta com pequeno número de fornecedores de matrizes, deste modo, o intercâmbio entre as propriedades na aquisição das mesmas é intensificado, o que também promove a troca de amostras bacterianas. O mesmo não ocorre quando se compara amostras de origem européia. Estas, apesar de pertencerem a sorogrupos distintos (O103, O132 e O128) formaram um “cluster” a aproximadamente 40% de similaridade, indicando que diferem geneticamente das amostras do

Estado de São Paulo. Neste caso, a distância entre as localidades talvez tenha sido suficiente para garantir pressão de seleção para formação de clones diferenciados.

O estudo de *E. coli* isoladas de fezes de coelhos no Estado de São Paulo revelou a presença de amostras AEEC, que à semelhança de amostras de mesma origem em estudos europeus, são responsáveis por diarreias brandas em animais desmamados. Em resumo, foram identificadas amostras com os dois fatores de virulência, até então, relacionados à amostras REPEC: capacidade de causar lesão A/E e presença da fimbria AF/R2, sendo que, na maioria, amostras com estas características pertenceram ao sorobiotipo O132:H2:B30 e apresentaram inserção de LEE em *pheU*.

Deste modo, esta pesquisa contribuiu na elucidação do papel de *Escherichia coli* como agente em potencial na diarreia de coelhos, aspecto ignorado por criadores e profissionais ligados a área, uma vez que, tanto quanto se saiba, não haviam pesquisas anteriores a esta, dedicadas à busca da bactéria e fatores de virulência característicos de *E. coli* diarreiogênicas para estes animais em nosso país e na América do Sul.

Outras características como subtipo de intimina, sorotipos, biotipos, ausência de produção de toxinas coincidem com aquelas expressas por amostras européias. A subtipagem da intimina de uma amostra e presença de amostras com locus de inserção de LEE indeterminado, necessitam ser posteriormente investigadas.

O possível papel de adesinas auxiliares na aderência das amostras às células eucarióticas, constitui-se de um importante material para pesquisas futuras, não só na revelação de dados interessantes para a patogênese da diarreia em coelhos, mas também contribuindo no estudo das amostras AEEC de origem humana e de outros animais.

7. CONCLUSÕES

O estudo de 178 amostras de *E. coli* isoladas de coelhos revelou fenótipos e genótipos comuns a colibacilos diarreiogênicos para esta espécie animal, como a presença do gene *eae* dos quais grande parte foi positiva no teste de FAS, além da presença do gene *afr2*. A capacidade de isolados *eae*⁺ e FAS⁺ em causar lesão A/E em células HeLa, também foi observada em todas as amostras testadas. Tais características sugerem a lesão “attaching and effacing” e a presença da fimbria AF/R2 como fatores de virulência em colibacilos isolados de coelhos no Estado de São Paulo.

O sorobiotipo O132:H2:B30, integrante dos sorobiotipos diarreiogênicos em países da Europa, foi predominante entre as amostras *eae*⁺ estudadas. Toxinas já descritas na literatura não estão relacionadas à diarreia em coelhos no Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, A.; de Grado, M.; Pfuetzner, R.A.; Sanchez-SanMartin, C.; DeVinney, R.; Puente, J.L.; Strynadka, C.J. & Finlay, B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. *Mol. Microbiol.* 33: 1162-1175, 1999.

Adu-Bobbie, 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: 662-668, 1998.

Aidar, L.; Pentado, A.S.; Trabulsi, L.R.; Blanco, J.E.; Blanco, M.; Blanco, J. & Pestana de Castro, A.F. Subtypes of intimin among non-toxigenic *Escherichia coli* from diarrheic calves in Brazil. *Can. J. Vet. Res.* 64: 15-20, 2000.

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. Lett.* 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.; Faruque, S.M.; Ansaruzzaman, M.; Islam, M.M.; Haider, K.; Alam, K. Kabir, I. & Robins-Browne, R. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. *J. Med. Microbiol.* 37: 310-314, 1992.

Baldini, M.M.; Kaper, J.B.; Levine, M.M.; Candy, D.C.A. & Moon, H.W. Plasmid-mediated adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2: 534-538, 1983.

Bando, S.Y.; Valle, G.R.F.; Martinez, M.B.; Trabulsi, L.R. & Moreira-Filho, C.A. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains by RAPD analysis. *FEMS Microbiol. Letters*. 165: 159-165, 1998.

Berendson, R.; Cheney, C.P.; Schad, E.C. & Boedecker, E.C. Species-specific binding of purified pili (AF/R1) from the *Escherichia coli* RDEC-1 to rabbit intestinal mucosa. *Gastroenterology*. 85: 837-845, 1983.

Bier, O. - Bacteriologia e Imunologia 13^a edição, Ed. Melhoram., pg. 816, 1966.

Beinke, C.; Laarmann, S.; Wachter, C.; Karch, H.; Greune, L. & Schmidt, M.A. Diffusely adhering *Escherichia coli* strains induce attaching and effacing phenotypes and secrete homologs of Esp proteins. *Infect. Immun.* 66: 528-539, 1998.

Bhan, M.K.; Raj, P.; Levine, M.M.; Kaper, J.B.; Bhandari, N.; Srivastava, R. Kumar, R. & Sazawal, S. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J.Infect. Dis.* 159:1061-1064, 1989.

Bilge, S.S.; Clausen, C.R.; Lau, W. & Moseley, S.L. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J. Bacteriol.* 171:4281-4289, 1989.

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 and CNF2. *FEMS Microbiol. Lett.*, 96:155-160, 1992.

Blanco, J. & Blanco M. *Escherichia coli* enterotoxigenicos, necrotoxigenicos y verotoxigenicos de origen humano y bovino. Patogênese, epidemiología y diagnóstico microbiológico. *Excma. Diputación Provincial de Lugo*. Cap. 4, 86-134, 1993a.

Blanco, M.; Blanco, J.E. & Blanco, J. Colibacilosis en conejos: vacunas. *Bol. Cun.* 68:18-23, 1993b.

Blanco, J.E.; Blanco, M.; Blanco, J.; Rioja, L. & Duchá, J. Serotypes, toxin and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic and healthy rabbits in Spain. *Vet. Microbiol.* 38: 193-201, 1994.

Blanco, J.E.; Blanco, M.; Blanco, J.; Mora, A.; Balaguer, L.; Mouriño, M.; Juárez, A & Jansen, W.H. O serogroups, biotypes and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *J.Clin. Microbiol.* 34: 3101-3107, 1996a.

Blanco, M.; Blanco, J.E.; Blanco, J.; Alonso, M.P.; Balsalobre, C.; Mouriño, M.; Madrid, C. & Juárez, A. Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). *J. Microbiol. Methods.* 26: 95-101, 1996b.

Blanco, M.; Blanco, J.E.; Mora, A.; Balaguer, L. & Blanco, J. *Escherichia coli* enteropatógenos (ECEP) para conejos: mecanismos de patogênese, serobiotipos, quimioterapia y vacunación. *Med. Vet.* 14: 133-144, 1997a.

Blanco, J.E.; Blanco, M.; Blanco, J.; Mora, A.; Balaguer, L.; Cuervo, L.; Balsalobre, C. & Muñoa, F. Prevalence and characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* with the *eae* gene in diarrhoeic rabbits. *Microbiol. Immunol.* 41: 77-82, 1997b.

Blanco, M.; Blanco, J.E.; Gonzalez, H.E.; Mora, A.; Jansen, W.; Gomes, T.A.T.; Zerbini, L.F.; Yano, T.; Pestana de Castro, A.F. & Blanco, J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationships with toxic phenotypes. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2958-2963, 1997c.

Blanco, J.E.; Blanco, M.; Mora, A.; Balaguer, L. & Blanco, J. *Escherichia coli* enteropatógenos (ECEP) para conejos: situación en España. *Med. Vet.* 14: 408-414, 1997d.

Broes, A.; Drolet, R.; Fairbrother, J.M. & Johnson, W.M. Natural infection with attaching and effacing *Escherichia coli* in a diarrheic puppy. *Can. J. Vet. Res.* 52: 280-282, 1998.

Camguilhem, R. & Milon, A. Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits: clues to diagnosis of pathogenic strains. *J. Clin. Microbiol.* 27: 743-747, 1989.

Cantey, J.R.; & Blake, R.K. Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J. Infect. Dis.* 135: 454-462, 1977.

Cantey, J.R.; Inman, L.R. & Blake, R.K. Production of diarrhea in the rabbit by mutant of *Escherichia coli* (RDEC-1) that does not express adherence (AF/R1) *pili*. *J. Infect. Dis.* 160: 136-141, 1989.

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.

China, B.; Jacquemin, E.; Devrin, A.C.; Pirson, V. & Mainil, J. Heterogeneity of the *eae* genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with human strains. *Res. Microbiol.* 150: 323-332, 1999.

Donnenberg, M.S. & Kaper, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60: 3953-3961, 1992.

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: 4670-4680, 1993.

Donnenberg, M.S.; Kaper, J.B. & Finlay, B.B. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol.* 5: 109-114, 1997.

Edwards, P.R. & Ewing, W.H. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing CO. Minneapolis, 1972.

Fiederling, F.; Boury, M.; Petit, C. & Milon, A. Adhesive factor/rabbit 2, a new fimbrial adhesin and a virulence factor from *Escherichia coli* O103, a serogroup enteropathogenic for rabbit. *Infect. Immun.* 65: 847-851, 1997.

Fisher, J.; Maddox, C.; Moseley, R.; Kinden, D. & Miller, M. Patogenicity of a bovine attaching and effacing *Escherichia coli* isolates lacking shiga-like toxin. *Am. J. Vet. Res.* 55: 991-999, 1994.

Finlay, B.B.; Rosenshine, I.; Donnenberg, M.S. & Kaper, J.B. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. *Infect. Immun.* 60: 2541-2543, 1992.

Frankel, G.; Candy, D.C.A.; Everest, P. & Dougan, G. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Rafnia alvei*. *Infect. Immun.* 62: 1835-1842, 1994.

Gannom, V. P. J.; Rashed, M.; King, R. K. & Thomas, E. J. G. Detection and characterization of the *eae* gene of shiga-like toxin - producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1268 - 1274, 1993.

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

Girón, J.A.; Donnenberg, M.S.; Martin, W.C.; Jarvis, K.G. & Kaper J.B. Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfp*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect.Dis.* 168: 1037-1041, 1993.

Griffin, P.M.; Ostroff, S.M.; Tauxe, V.R.; Greene, K.D.; Wells, J.G.; Lewis, J.H. & Blake, P.A. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Ann. Intern. Med.* 109: 705-712, 1988.

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

Heezo, U.; Abe, A. & Finlay, B.B. In vivo interactions of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* O103 with its host: an electron microscopic and histopathologic study. *Microbes Infect.* 2: 5-16, 2000.

Hicks, S.; Candy, D.C.A. & Phillips, A.D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect. Immun.* 64: 4751-4760, 1996.

Hicks, S.; Frankel, G.; Kaper, J.B.; Dougan, G. & Phillips, 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.

Jarvis, K.G.; Girón, J.A.; Jerse, A.E.; McDaniel, T.K.; Donnenberg, M.S. & Kaper, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesions formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 7996-8000. 1995.

Jerse, A.E.; Yu, J.; Tall, B.D. & Kaper, J.B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 7839-7843, 1990.

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.

Jores, J.; Rumer, L.; Kiebling, S.; Kaper, J.B. & Wieler, L.H. A novel locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island inserted at *pheV* in bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain O103H2. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 75-79, 2001.

Kaper, J.B.; Elliot, S.; Sperandio, V.; Perna, N.T.; Mayhew, G.F. & Blattner, F.R. Attaching-and-effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin producing *E. coli* strains. *ASM Press, Washington, D.C.* Cap. 18: 163-182, 1998.

Karaolis, D.K.R.; McDaniel, T.K.; Kaper, J.B. & Boedeker, E.C. Cloning of the RDEC-1 locus of enterocyte effacement (LEE) and functional analysis of the phenotype on HEP-2 cells. *Ad. Exp. Med. Biol.* 412: 241-245, 1997.

Kenny, B.; Lai, L.C.; Finlay, B.B. & Donnenberg, M.S. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is required to induce signals in epithelial cells: *Mol. Microbiol.* 20: 313-323, 1996.

Kenny, B.; Devinney, R.; Stein, M.; Reinscheid, D.J.; Frey, E.A. & Finlay, B.B. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91: 511-520, 1997.

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.

Knutton, S.; Baldwin, T.; Williams, P.H. & McNeish, A.S. Actin accumulation at sites of bacterial 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.; Phillips, A.D.; Smith, H.R.; Gross, R.J.; Shaw, R.; Watson, P. & Price, E. Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent-actin staining test. *Infect. Immun.* 59: 365-371, 1991.

Knutton, S.; Rosenshine, I.; Pallen, M.J.; Nisan, I.; Neves, B.C.; Bain, C.; Wolff, C.; Dougan, G. & Frankel, G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.* 17: 2166-2176, 1998.

Krejany E.O.; Grant, T.H.; Bennett-Wood, V; Adams, L.M. & Robins-Browne, R.M. Contribution of plasmid-encoded fimbriae and intimin to capacity of rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli* to attach to and colonize rabbit intestine. *Infect Immun.* 68: 6472-6477, 2000.

Kresse, A.U.; Rohde, M. & Guzmán, C.A. The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. *Infect. Immun.* 67: 4834-4842, 1999.

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.

Leroy, S.M.; Lesage, M.C.; Charlus-Dancla, E. & Lafont, J.P. Presence of *eaeA* sequences in pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from weaned rabbits. *J. Med. Microbiol.* 40: 90-94, 1994.

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

Licois, D.; Reynaud, A.; Federighi, M.; Martinie, B.G.; Guillot, J.F. & Joly, B. Scanning and transmission electron microscopic study of adherence of *Escherichia coli* O103 enteropathogenic and/or enterohemorrhagic strain GV in enteric infection in rabbits. *Infect. Immun.* 59: 3796-3800, 1991.

Luft, J.H. & Glauert, A.M. Practical methods in electron microscopy fixation, dehydration and embedding of biological specimens. *Amsterdam North-Holland*, p. 132, 1984.

Marchès, O; Nougayrède, J.P.; Boullier, S.; Mainil, J.; Charlier, G.; Raymond, I.; Pohl, P.; Boury, M.; Rycke, J.; Milon, A. & Oswald, E. Role of tir and intimin in the virulence of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O103:H2. *Infect. Immun.* 68: 2171-2182, 2000.

Mathewson, J.J. & Cravioto, A. HEp-2 cell adherence as an assay for virulence among diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 159: 1057-1060, 1989.

McDaniel, T.K.; Jarvis, K.G.; Sonnenberg, 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.

McNamara, B.P.; Koutsouris, A.; O'Connell, C.B.; Nougayrede, J.P.; Sonnenberg, M.S. & Hecht, G. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupt host intestinal barrier function. *J. Clin. Invest.* 107: 621-629, 2001.

Milon, A.; Esslinger, L. & Camguilhem, R. Adhesion of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic weaned rabbits to intestinal villi and HeLa cells. *Infect. Immun.* 58: 2690-2695, 1990.

Moon, H.W.; Whipp, S.C.; Argenzio, R.A.; Levine, M.M. & Gianella, R.A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia 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.* 48: 378-383, 1985.

Nataro, J.P.; Kaper, J.B.; Robins-Browne, R.; Prado, V.; Vial, P. & Levine, M.M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6: 829-831, 1987.

Nataro, J.P. Molecular diagnosis of EPEC. *Rev. Microbiol.* 27: 54-57, 1996a.

Nataro, J.P. Non-EPEC *Escherichia coli* that adhere to HEp-2 cells. *Rev. Microbiol.* 27: 67-71, 1996b.

Nataro, J.P.; Hicks, S.; Phillips, A.D.; Vial, P.A. & Sears, C.L. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect. Immun.* 64: 4761-4768, 1996c.

Nougayrede, J.P.; Marches, O.; Boury, M.; Mainil, J.; Charlier, G.; Pohl, P.; DeRycle, J.; Milon, A. & Oswald, E. The long-term cytoskeletal rearrangement induced by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* is Esp dependent but intimin independent. *Mol. Microbiol.* 31:19-30, 1999.

O'Brien, A.D.; Veck, L.A.; Thompsonm.R. & Formal, S.B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 146: 763-769, 1982.

O'Hanley, P.D. & Cantey, J.P. Surface structure of *Escherichia coli* that produce diarrhea by a variety of enteropathic mechanism. *Infect. Immun.* 21: 874-878, 1985.

Okerman, L. & Devriese, L.A. Biotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* strains from rabbits. *J. Clin. Microbiol.* 22: 955-958, 1985.

Oswald, O.; Schmidt, H.; Morabito, S.; Karch, H.; Marchès, O. & Caprioli, A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.* 68: 64-71, 2000.

Peeters, J.E.; Charlier, G.J. & Halen, P.H. Pathogenicity of attaching effacing enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic suckling and weanling rabbits for newborn rabbits. *Infect. Immun.* 46: 690-696, 1984a.

Peeters, J.E.; Pohl, P.; Okerman, L. & Devriese, L. A. Pathogenic properties of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *J. Clin. Microbiol.* 20: 34-39, 1984b

Peeters, J.E.; Pohl, P. & Charlier, G. Infectious agents associated with diarrhoea in commercial rabbits: a field study. *Ann. Rech. Vét.* 15: 335-340, 1984c.

Peeters, J.E. Etiology and pathology of diarrhoea in weanling rabbits. In: Auxilia, T., Rabbit production systems including welfare. *CEE, Luxemburg*, p: 127-137, 1987.

Peeters, J.E.; Geeroms, R. & Orskov, F. Biotype, serotype and pathogenicity of attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolates from diarrheic commercial rabbits. *Infect. Immun.* 56: 1442-1448, 1988.

Peeters, J.E. *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) du lapin. *Ann. Méd. Vét.* 137: 361-368, 1993.

Pelayo, J.S.; Scaletsky, I.C.A.; Pedroso, M.Z.; Sperandio, V.; Girón, J. A.; Frankel, G. & Trabulsi, L.R. Virulence properties of atypical EPEC strains. *J. Med. Microbiol.* 48: 41-49, 1999.

Penteado, A.S.; Aidar, L., Pestana de Castro, A.F.; Yamada, A.; Andrade, J.R.C.; Blanco, J.; Blanco, M.; & Blanco, J.E. *eae*-negative attaching and effacing *Escherichia coli* from piglets with diarrhea. *Res. Microbiol.* 152: 75-81, 2001.

Percy, D.H.; Muckle, A.C.; Hampson, R.J. & Brash, M.L. The enteritis complex in domestic rabbits: A field study. *Can. Vet. J.* 34: 95-102, 1993.

Pohl, P.H.; Peeters, J.E.; Jacquemin, E.R.; Lintermans, P.F. & Mainil, J.G. Identification of *eae* sequences in enteropathogenic *Escherichia coli* strains from rabbits. *Infec. Immun.* 61: 2203-2206, 1993.

Popschil A.; Mainil, J.G.; Balger, G. & Moon, H.W. Attaching and effacing bacteria in the intestines of calves and cats with diarrhea. *Vet. Pathol.* 24: 330-334, 1987.

Prescott, J.F. *Escherichia coli* and diarrhoea in rabbit. *Vet. Pathol.* 15: 137-248, 1978.

Reynaud, A.; Federig, M.; Licois, D.; Guillot, J.F. & Joly, B.R. R Plasmid in *Escherichia coli* O103 coding for colonization of the rabbit intestinal tract. *Infect. Immun.* 59: 1888-1892, 1991.

Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-213, 1963.

Robins-Browne, M.R.; Tokhi, A.M.; Adams, L.M.; Bennet-Wood, V.; Moisidis, A.V., Krejany, E.O. & O’Gorman, L.E. Adherence characteristics of attaching and effacing strains of *Escherichia coli* from rabbits. *Infect. Immun.* 62: 1584-1592, 1994.

Rodrigues, J.; Scaletsky, I.C.A.; Campos, L.C.; Gomes, T.A.T.; Whittan, T. & Trabulsi, L.R. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect. Immun.* 64: 2680-2686, 1996.

Scaletsky, I.C.A.; Milani, S.R.; Trabulsi, L.R. & Travassos, L.R. Isolation and characterization of the localized adherence factor of enteropathogenic *E. coli*. *Infect. Immun.*, 56: 2979-2983, 1988.

Scaletsky, I.C.A.; Pelayo, J.S.; Girard, R.; Rodrigues, J.; Pedroso, M. Z. & Trabulsi, L.R. EPEC adherence to HEp-2 cells. *Rev. Microbiol.* 27: 58-62, 1996.

Scaletsky, I.C.A.; Pedroso, M.Z.; Oliva, C.A.G.; Carvalho, R.L.B.; Morais, M.B. & Fagundes-Neto, U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of

classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect. Immun.* 34:10-3415, 1999.

Schauer, D.B. & S. Falkow, S. Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype 4280 that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect. Immun.* 61: 2486-2492, 1993.

Schmidt, H.; Beutin, L. & Karch, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *Infect. Immun.* 63, 1055-1061. 1995.

Schultsz, C.; Pool, G.J.; van Ketel, R.; de Wevek, B., Speelman, P. & Dankert, J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2393-2397, 1994.

Silva, M.L.; Mortara, R.A.; Barros, H.C.; Souza, W. & Trabulsi, L.R. Aggregation of membrane-associated actin filaments following localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *J. Cell Sci.* 93: 439-446, 1989.

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.

Taylor, K.A.; O'Connell, C.B.; Juthier, P.W. & Donnenberg, M.S. The EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells. *Infect. Immun.* 66: 5501-5507, 1998.

Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F. & Trabulsi, L.R. EPM- Modificação do meio de Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glucose, H₂S, urease e triptofano desaminase. *Rev. Microbiol.* 13: 309-315, 1982a.

Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F. & Trabulsi, L.R. Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *Rev. Microbiol.* 13: 230-235, 1982b.

Trabulsi, L.R.; Campos, L.C.; Whittan, T.S.; Gomes, T.A.T.; Rodrigues, J. & Gonçalves, A.G. Traditional and non-traditional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. *Rev. Microbiol.* 27: 1- 6, 1996.

Trabulsi, L.R.; Keller, R. & Gomes, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 508-513, 2002.

Tzipori, S.; Wachsmuth, K.; Chapman, C.; Birner, R.; Jackson, C. & Hogg, Y. Studies on the pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by *E. coli* 0157:H7 in gnotobiotic piglets. *J.Infect.Dis.* 154: 712-716, 1986.

Vallance, B.A. & Finlay, B.B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 8799-8806, 2000.

Varga, J. & Pesti, L. Serological and some pathological characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from rabbits. *Zbl. Vet. Med.* 29: 145-152, 1982.

Vieira, M.A.M.; Andrade, J.R.C.; Trabulsi, L.R.; Rosa, A.C.P.; Dias, A.M.G.; Ramos, S.R.T.S.; Frankel, G.; & Gomes, T.A.T. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and shiga toxin DNA probe sequences. *J. Infec. Dis.* 183: 762-72, 2001.

Von Moll, L.K. & Cantey, J.R. Peyer's patch adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* strains in rabbits. *Infect. Immun.* 65: 3788-3793, 1997.

Wainwright, L.A. & Kaper, J.B. EspB and EspD requires a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 27: 1247-1260, 1998.

Watson, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Citol.* 4: 475-478, 1963.

Welsh, J.; Peterson, C. & McClelland, M. Polymorphisms generated by arbitrary primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucl. Ac. Res.* 19: 303-306, 1991.

Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.L.; Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Ac. Res.* 18: 6531-6535, 1990.

Wilson, R.K.; Shaw, R.K.; Daniell, S.; Knutton, S. & Frankel, G. Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* 3: 753, 2001.

Wolf, C.; Nisan, I.; Hanski, E.; Frankel, G.; Rosenshine, I. Protein translocation into HeLa cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 28: 143-155, 1998.

Zhu, C.; Harel, J.; Jacques, M.; Desautels, C.; Donnenberg, M.S.; Beaudry, M. & Fairbrother, J.M. Virulence properties and attaching and effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine post-weaning diarrhea. *Infect. Immun.* 62: 4153-4159, 1994.

Zhu, C.; Agin, T.S.; Elliot, S.J.; Johnson, L.A.; Thate, T.E.; Kaper, J.B. & Boedeker, E.C. Complete nucleotide sequence analysis of enterocyte effacement from rabbit diarrheagenic *Escherichia coli* RDEC-1. *Infect. Immun.* 69: 2107-2115, 2001.

ANEXO

Tabela Geral: Resultados obtidos no estudo de amostras de *E. coli* isoladas de coelhos

AMOSTRA	DIARRÉIA	eae	INTIMINA	LEE	SOROTIPO	BIOTIPO	FÍMBRIA	ADERÊNCIA		FAS
								3H	6H	
1	+ ^a	- ^b	^c		NT:NR ^d	28 ^e	NR ^f	NR	NR	NR
2	+	-			NT:NR	28	NR	NR	NR	NR
3	-	-			NT:NR	28	NR	NR	NR	NR
5	+	-			NT:NR	18	NR	NR	NR	NR
7	+	+	β	<i>pheU</i>	O126:H-	28	AF/R2	LAL	LAL	+
8	+	-			NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
12	+	+	β	<i>pheU</i>	O126:H-	30	AF/R2	-	LAL	-
21	+	-			O128:NR	30	NR	NR	NR	NR
24	+	-			NT:NR	19	NR	NR	NR	NR
25	-	+	ND ^g	<i>selC</i>	O145:H?	31	-	NC	LAL	+
32	+	-			NT:NR	28	NR	NR	NR	NR
34	+	-			NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
38	+	-			NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
39	+	-			NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
40	+	-			NT:NR	24	NR	NR	NR	NR
43	-	-			NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
44	+	-			NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
49	-	-			NT:NR	28	NR	NR	NR	NR
50	-	-			NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
54	+	-			NT:NR	29	NR	NR	NR	NR
59	+	-			NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
62	+	-			NT:NR	29	NR	NR	NR	NR
68	+	-			NT:NR	28	NR	NR	NR	NR
A	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
B	+	+	β	<i>selC</i>	NT:H6	24	-	-	-	NR
C	+	-			O103:H19	28	NR	NR	NR	NR
D	+	+	β	<i>selC</i>	NT:H6	26	-	NC	-	NR
F	+	-			O103:H19	28	NR	NR	NR	NR
G	+	-			NT:NR	18	NR	NR	NR	NR
H	+	-			O103:H19	28	NR	NR	NR	NR
J	+	-			O103:H19	28	NR	NR	NR	NR
L	+	-			O103:H19	28	NR	NR	NR	NR
N	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	28	AF/R2	-	LAL	-
O	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	-
Q	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	+
R	+	+	β	<i>selC</i>	NT:H6	26	-	-	-	NR
S	+	+	β	<i>selC</i>	NT:H1	30	-	NC	-	NR
U	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	28	AF/R2	NC	LAL	+
V	+	-			NT:NR	18	NR	NR	NR	NR
Z	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
Y	+	-			O103:19	28	NR	NR	NR	NR
K	+	-			NT:NR	30	NR	NR	NR	NR

AMOSTRA	DIARRÉIA	eae	INTIMINA	LEE	SOROTIPO	BIOTIPO	FÍMBRIA	ADERÊNCIA		FAS
								3H	6H	
χ	+	-	-	-	NT:NR	28	NR	NR	NR	NR
b	+	-	-	-	NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
c	+	-	-	-	NT:NR	16	NR	NR	NR	NR
d	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
e	+	-	-	-	NT:NR	16	NR	NR	NR	NR
f	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	28	AF/R2	NC	LAL	+
g	+	-	-	-	NT:NR	9	NR	NR	NR	NR
i	-	-	-	-	NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
j	-	-	-	-	NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
l	-	-	-	-	NT:NR	9	NR	NR	NR	NR
m	-	-	-	-	NT:NR	16	NR	NR	NR	NR
n	+	-	-	-	NT:NR	16	NR	NR	NR	NR
p	+	-	-	-	NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
r	+	-	-	-	NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
t	+	-	-	-	NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
x	+	-	-	-	NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
79	+	-	-	-	NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
87	-	-	-	-	NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
88	+	-	-	-	NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
89	+	-	-	-	NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
93	+	-	-	-	NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
94	+	-	-	-	NT:NR	29	NR	NR	NR	NR
95	+	-	-	-	NT:NR	29	NR	NR	NR	NR
97	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	-	LAL	-
β	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	-
99	+	-	-	-	NT:NR	29	NR	NR	NR	NR
100	+	-	-	-	NT:NR	31	NR	NR	NR	NR
101	+	-	-	-	O41:H-	30	NR	NR	NR	NR
102	+	-	-	-	O41:H-	30	NR	NR	NR	NR
103	+	-	-	-	O41:H-	30	NR	NR	NR	NR
106	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	28	AF/R2	NC	LAL	+
107	+	-	-	-	O41:H-	30	NR	NR	NR	NR
108	+	-	-	-	O103:H19	28	NR	NR	NR	NR
109	+	+	β	<i>selC</i>	O110:H6	30	-	AA	-	NR
110	+	-	-	-	O41:H-	30	NR	NR	NR	NR
111	+	-	-	-	O103:H19	28	NR	NR	NR	NR
112	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	+
113	+	+	β	<i>selC</i>	O110:H6	26	-	-	-	NR
115	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
116	+	+	β	<i>selC</i>	NT:H6	26	-	-	-	NR
117	+	-	-	-	NT:NR	29	NR	NR	NR	NR
118	+	+	β	<i>selC</i>	NT:H6	26	-	NC	NC	-
119	+	+	β	<i>selC</i>	O110:H6	30	-	-	-	NR
120	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	-	LAL	-
121	+	-	-	-	NT:NR	2	NR	NR	NR	NR
122	-	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	-	LAL	-
123	+	-	-	-	O103:H19	28	NR	NR	NR	NR
126	+	+	β	<i>selC</i>	O110:H6	26	-	-	-	NR

AMOSTRA	DIARRÉIA	eae	INTIMINA	LEE	SOROTIPO	BIOTIPO	FÍMBRIA	ADERÊNCIA		FAS
								3H	6H	
127	+	-			NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
128	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	+
129	+	-			O103:H19	28	NR	NR	NR	NR
130	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
133	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	AA	LAL	+
134	+				O103:H19	28	NR	NR	NR	NR
136	+	+	β	pheU	O132:H2	30	-	NC	LAL	+
137	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
138	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	-	-	NR
139	+	+	β	pheU	O132:H2	28	AF/R2	-	LAL	-
140	+	-			NT:NR	31	NR	NR	NR	NR
141	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
143	+	+	β	ND	O128:H2	28	AF/R2	LAL	LAL	+
144	-	+	β	ND	O128:H2	28	AF/R2	LAL	LAL	+
145	+	-			NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
146	+	-			NT:NR	19	NR	NR	NR	NR
147	+	+	β	ND	O128:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
148	+	-			NT:NR	17	NR	NR	NR	NR
149	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
150	-	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
151	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	-	LAL	-
153	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	-
154	+	+	β	ND	O128:H2	30	AF/R2	LAL	LAL	+
155	+	+	β	ND	O128:H2	28	AF/R2	LAL	AA	-
156	+	-			NT:NR	17	NR	NR	NR	NR
157	+	+	β	ND	O128:H2	28	-	NC	NC	-
158	+	-			NT:NR	19	NR	NR	NR	NR
159	+	-			NT:NR	31	NR	NR	NR	NR
160	+	-			O20:H28	30	NR	NR	NR	NR
161	+	-			O2:NR	29	NR	NR	NR	NR
163	+	-			O21:NR	19	NR	NR	NR	NR
164	+	-			O2:NR	25	NR	NR	NR	NR
165	+	-			O2:NR	25	NR	NR	NR	NR
166	-	-			O4:H1	17	NR	NR	NR	NR
167	-	-			O4:H1	17	NR	NR	NR	NR
169	-	-			O21:NR	19	NR	NR	NR	NR
177	+	-			NT:NR	28	NR	NR	NR	NR
178	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
179	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
180	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
181	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	+
182	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
183	+	-			O103:H19	28	NR	NR	NR	NR
184	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	AA	LAL	+
185	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	+
188	+	+	β	pheU	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+

AMOSTRA	DIARRÉIA	eae	INTIMINA	LEE	SOROTIPO	BIOTIPO	FÍMBRIA	ADERÊNCIA		FAS
								3H	6H	
189	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
190	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	24	-	NC	AA	+
191	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	AA	AA	+
193	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	+
194	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	AA	+
196	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	+
197	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
199	+	+	β	ND	O153:H7	30	AF/R2	NC	NC	-
200	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	AA	+
201	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	AA	+
202	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	+
203	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	AA	AA	+
204	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	AA	+
205	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	-
206	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	+
208	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	AA	+
209	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	+
210	+	+	β	ND	O153:H7	28	AF/R2	-	-	NR
212	+	-			NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
214	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	AA	+
215	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	-
216	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	AA	+
217	+	+	β	ND	O126:H20	28	-	NC	AA	-
219	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	LAL	LAL	+
220	+	-			NT:NR	28	NR	NR	NR	NR
221	+	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	-	LAL	-
223	+	-			NT:NR	30	NR	NR	NR	NR
224	+	-			NT:NR	28	NR	NR	NR	NR
226	-	-			NT:NR	24	NR	NR	NR	NR
227	-	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	-	LAL	-
231	-	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	-	LAL	-
232	-	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
234	-	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	-	LAL	-
235	-	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	LAL	+
236	-	+	β	ND	O153:H7	28	AF/R2	NC	LAL	-
237	-	+	β	ND	O1:H45	26	AF/R2	NC	NC	-
238	-	+	β	ND	O153:H7	28	AF/R2	NC	LAL	-
240	-	-			NT:NR	28	NR	NR	NR	NR
242	-	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	+
243	-	+	β	ND	O153:H7	28	AF/R2	-	LAL	-
245	-	+	β	<i>pheU</i>	O132:H2	30	AF/R2	NC	NC	-
246	-	+	β	ND	O153:H7	28	AF/R2	NC	NC	-

- ^a: Resultado positivo para o teste em questão.
- ^b: Resultado negativo para o teste em questão.
- ^c: Teste de realização inviável.
- ^d: Amostra não sorotipada.
- ^e: Número do biotipo.
- ^f: Teste não realizado.