

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/41509

IB/81508

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

V23

d

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

**DETECÇÃO DO FATOR DE COLONIZAÇÃO CS31A EM
AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE BEZERROS COM
DIARRÉIA E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATORES DE VIRULÊNCIA**

GEÓRGIO FREESZ VALADARES
Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Georgio Freesz Valadares
e aprovada pela Comissão Julgadora.

2/3/2000 

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

Campinas, 2000

| | |
|----------------------------|---------------------------------------|
| UNIDADE | IB |
| N.º CHAMADA: | 7/UNICAMP |
| | V23d |
| V. | Ex. |
| TOMBO BC/41509 | |
| PROC. 278/00 | |
| C <input type="checkbox"/> | D <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO R\$ 11,00 | |
| DATA 11-07-00 | |
| N.º CPD | |

CM-00142397-3

**FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

V23d **Valadares, Géorgio Freesz**
Detecção do fator de colonização CS31A em amostras de
Escherichia coli isoladas de bezerros com diarreia e sua
associação com fatores de virulência. - - Campinas, SP:[s.n.],
2000.

81f.:ilus.

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

1. *Escherichia coli*. 2. Diarréia. 3. Virulência. 4. Bovinos. I.
Leite, Domingos da Silva. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 02/03/2000

Banca Examinadora

Titulares:



Prof. Dr. Domingos da Silva Leite



Prof. Dr. Tomomasa Yano



Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

Suplente:

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Para realização deste trabalho nos foi concedida bolsa de mestrado e auxílio financeiro do projeto pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo 97/13193-7 e pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

*"Nós geralmente descobrimos o que fazer
percebendo aquilo que não devemos fazer.
E provavelmente aquele que nunca
cometeu um erro nunca fez
uma descoberta."
Samuel Smiles*

*A meus pais, Jorge e Elizabeth,
pelo amor e dedicação
durante toda a minha jornada,
dedico.*

Agradecimentos:

A Deus, que tem nos dado curiosidade suficiente para investigarmos sua obra, que ainda assim não conseguimos dar o devido valor.

A meus familiares, pelo apoio e compreensão.

Ao Prof. Domingos, por sua amizade desde o meu primeiro contato com a microbiologia (em 1994), por seu conhecimento, sua dedicação e paciência em relação às minhas intermináveis “perguntas”.

Aos colegas, professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Em especial à Lourdes, secretária do Curso, por sua infundável paciência para comigo, ao lidar com aqueles milhares de pareceres, formulários e afins.

Aos meus AMIGOS e colegas do Laboratório, por todos os momentos agradáveis que passamos juntos pelas horas de reflexão e pelas horas difíceis que, sendo tão poucas, quase ficaram apagadas quando comparadas com as demais.

ÍNDICE GERAL

| | |
|--|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | iv |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | vi |
| RESUMO..... | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| | |
| 1 - INTRODUÇÃO..... | 1 |
| - <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC)..... | 3 |
| - <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)..... | 6 |
| - <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)..... | 8 |
| - <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC)..... | 9 |
| - <i>Escherichia coli</i> Difusamente Aderente (DAEC)..... | 10 |
| - CDT..... | 11 |
| - CNFs..... | 12 |
| - <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC)..... | 14 |
| Enterotoxina termo-lábil do tipo I (LT-I)..... | 16 |
| Enterotoxina termo-lábil do tipo II (LT-II)..... | 17 |
| Enterotoxina termo-estável do tipo I (ST-I ou ST-a)..... | 18 |
| Enterotoxina termo-estável do tipo II (ST-II OU ST-b)..... | 18 |
| Fatores de Colonização..... | 19 |
| | |
| 2 - OBJETIVOS..... | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 3 - MATERIAIS E MÉTODOS..... | 24 |
| 3.1 - Amostras Bacterianas..... | 24 |
| 3.1.1 - Amostras Padrão..... | 24 |
| 3.1.2 - Amostras de Campo..... | 25 |
| 3.2 - Detecção Biológica dos Fatores de Virulência por Ensaio Biológicos..... | 25 |
| 3.2.1 - Detecção dos Fatores de Colonização (FCs)..... | 25 |
| 3.2.2 - Detecção de Toxinas..... | 26 |
| A) Cultivo das Amostras e Obtenção das Toxinas..... | 26 |
| B) Ensaio para Verificação da Produção da Enterotoxina Termo-Estável do Tipo I (ST-I)..... | 26 |
| C) Detecção de “Shiga-Like Toxins” (Stx) e do Fator Necrosante Citotóxico (CNF)..... | 27 |
| 3.4 - Determinação do Antígeno “O” | 27 |
| 3.4.1 - Preparação da Suspensão Bacteriana..... | 27 |
| 3.4.2 - Soroaglutinação em Placa..... | 28 |
| 3.5 - Ensaio Molecular para Detecção do Fatores de Virulência..... | 29 |
| 3.5.1 - Escolha dos Iniciadores para o CS31A..... | 29 |
| 3.5.2 - Obtenção do DNA Bacteriano..... | 31 |
| 3.5.3 - Ensaio de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)..... | 33 |
| 3.5.4 - Eletroforese em Gel de Agarose..... | 36 |

| | |
|---|----|
| 4 - RESULTADOS..... | 37 |
| 4.1- Ensaio de soroprecipitação frente ao antissoro anti-CS31A..... | 37 |
| 4.2 - Confirmação Genética do CS31A..... | 42 |
| 4.2.1 - Verificação da Funcionalidade e Especificidade dos Iniciadores para o CS31A..... | 42 |
| 4.2.2 - Comprovação da Funcionalidade dos Iniciadores para o CS31A..... | 44 |
| 4.2.3 - Estudo das Amostras de Campo Quanto à Presença dos Genes para o CS31A..... | 46 |
| 4.3 - Co-expressão de Outros Fatores de Virulência..... | 46 |
| 4.3.1 - Fatores de Colonização..... | 46 |
| A) Detecção do F5 (K99)..... | 46 |
| B) Detecção do F17..... | 48 |
| C) Detecção do F41..... | 49 |
| D) Detecção do F165..... | 49 |
| 4.3.2 - Detecção de Toxinas..... | 49 |
| A) Detecção de CNF..... | 49 |
| B) Detecção de EAST-I..... | 51 |
| C) Detecção de ST-I..... | 52 |
| D) Detecção de Stx-I e Stx-II..... | 53 |
| 5 - DISCUSSÃO..... | 62 |
| 6 - CONCLUSÕES..... | 72 |
| 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 73 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Seqüência do gene <i>clpG</i> , que codifica a subunidade principal do CS31A, baseado em KORTH e COL. (1991) e GIRARDEAU e COL. (1991)..... | 29 |
| Figura 2. Alinhamento comparativo entre as seqüências de aminoácidos das subunidades das adesinas CS31A, K88 e F41, com base em GIRARDEAU (1991)..... | 30 |
| FIGURA 3. Distribuição das amostras testadas, de acordo com o fenótipo apresentado no teste de soroaglutinação..... | 41 |
| FIGURA 4. PCR das amostras padrão frente ao CS31A..... | 42 |
| FIGURA 5. Perfil das amostras CS31A positivas fenotipicamente ao serem testadas em PCR..... | 43 |
| FIGURA 6. PCR para verificação da funcionalidade dos iniciadores para o CS31A..... | 45 |
| FIGURA 7. PCR das amostras de campo para o F5(K99)..... | 47 |
| FIGURA 8. PCR das amostras de campo para o F5(K99)..... | 47 |
| FIGURA 9. PCR das amostras de campo para o F17..... | 48 |
| FIGURA 10. PCR das amostras de campo para o F17..... | 48 |
| FIGURA 11. PCR das amostras de campo para o CNF..... | 50 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 12. PCR das amostras de campo para o CNF..... | 50 |
| FIGURA 13. PCR das amostras de campo para o CNF..... | 50 |
| FIGURA 14. PCR das amostras de campo para EAST-I..... | 51 |
| FIGURA 15. PCR das amostras de campo para EAST-I..... | 52 |
| FIGURA 16. PCR das amostras de campo para ST-I..... | 52 |
| FIGURA 17. PCR das amostras de campo para ST-I..... | 53 |
| FIGURA 18. PCR das amostras de campo para Stx-I..... | 53 |
| FIGURA 19. Presença de outros FCs dentre as amostras CS31A positivas..... | 57 |
| FIGURA 20. Presença de genes para toxinas dentre as amostras CS31A positivas..... | 58 |
| FIGURA 21. Distribuição dos sorogrupos encontrados nas amostras CS31A positivas..... | 59 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1. Verificação da expressão do CS31A em amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem bovina, determinado por ensaio de soroaglutinação | 38 |
| TABELA 2. Presença de outros fatores de virulência nas amostras nas amostras CS31A positivas em ensaios biológicos e moleculares..... | 55 |

RESUMO

Infecções por *Escherichia coli* são freqüentes em animais domésticos, afetando principalmente animais recém nascidos e no período do pós-desmame, sendo assim responsáveis por importantes danos econômicos na suinocultura e pecuária de bovinos e ovinos.

Dentre os fatores de colonização (FCs) descritos em *E. coli* de bovinos, o CS31A está relacionado com diarreia, ataxia, astenia e septicemia e, segundo a literatura, não consta no Brasil.

Estudamos 255 amostras isoladas de fezes de bezerros com diarreia, a fim de verificar a presença do CS31A e sua associação com os fatores de virulência F5 (K99), F17, F41, F165, (ST-I), (EAST-I), (Stx-I e Stx-II), (CNF-I e CNF-II). Para os estudos utilizamos ensaios biológicos e ensaios de reação de polimerase em cadeia (PCR) empregando iniciadores específicos para cada fator em questão.

Das amostras estudadas, 47 (18%) foram positivas para o CS31A, destas, 9 (19,14%) foram associadas a F17, 5 (10,63%) F5, 2 (4,25%) foram F165, 4 (8,51%) foram F5 e F17 enquanto 27 (57,44%) foram positivas apenas para o CS31A. Quanto à presença de genes para toxinas, 9 (19,08%) foram positivas para o EAST-I, 1, (2,12%) positiva par Stx-I, 3 (6,38%) amostras positivas para o CNF-I, 7 (14,84%) para ST-I e CNF-I, 2 (4,24%) para EAST-I e CNF-I e 3 (6,38%) para EAST-I e Stx-I; enquanto 22 (46,64%) amostras não se mostraram toxigênicas. Os resultados sugerem que o CS31A é importante para a patogenicidade das *E. coli* bovinas no Brasil, mostrando sua associação com outros fatores de virulência.

ABSTRACT

Infections from *Escherichia coli* (ETEC) are frequent in domestic animals, affecting mainly newborn animals in the postweaned period, being thus responsible for important economic losses in the cattle, porcine and lamb herds. Amongst the colonization factors (FCs) associated with *E. coli* in bovines, the CS31A is related with diarrhoea, ataxia, asthenia and septicemia in calves and, according to literature, does not exist in Brazil.

We studied 255 *E. coli* strains isolated from faeces of calves with diarrhoea, in order to verify the presence of CS31A and its eventual association with the following virulence factors: F5(K99), F17, F41, F165, ST-I, EAST-I, Stx-I and Stx-II, CNF-I and CNF-II. For the studies we used polymerase chain reaction (PCR) using specific primers for each factor.

Of the studied strains, 47 (18%) had been positive for CS31A, of these 9 (19,14%) had been associated with F17, 5 (10,63%) with F5(K99), 2 (2,45%) with F165, 4 (8,51%) with F17 and F5 together and 27 (57,44%) positive only for CS31A. About the presence of toxin genes, 9 (19,14%) strains were positive for EAST-I, 1 (2,12%) positive strain for Stx-I, 3 (6,38%) for CNF-I, 7 (14,84%) for ST-I and CNF-I together, 2 (4,25%) for EAST-I and CNF-I and 3 (6,38%) had been EAST-I and Stx-I; while 22 (46,64%) strains were not toxigenic. These results suggest that CS31A is important for the pathogenicity of *E. coli* in Brazil, showing its association with other virulence factors.

1- INTRODUÇÃO:

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, classificado dentro da família *Enterobacteriaceae* (HOLT e COL., 1994) que foi descoberto em 1885 por Theodor Escherich que denominou-o inicialmente *Bacterium coli*. É a espécie predominante entre os anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal do homem e de outros animais homeotérmicos. O organismo coloniza tipicamente o trato gastrointestinal dos recém nascidos poucas horas após o nascimento e, posteriormente, *E.coli* e o hospedeiro vivem em benefício mútuo. As *E. coli* normalmente permanecem inofensivas no lúmen intestinal. Contudo, quando o hospedeiro encontra-se debilitado ou imunossuprimido, ou quando barreiras gastrointestinais são violadas, até mesmo linhagens “não patogênicas” normais podem causar infecções. Além disso, algumas linhagens são patogênicas e podem produzir infecções entéricas, tais como diarreia, disenteria, colite hemorrágica. Complicações a partir destas, uremia hemolítica e doença do edema ou infecções extraintestinais, tais como infecções do trato urinário, septicemias, meningites, peritonites e infecções pulmonares, no homem e nos animais (BLANCO e COL. 1993).

Como a maioria dos patógenos de mucosas, pode-se dizer que as *E.coli* seguem uma estratégia de infecção: i) Colonização da mucosa, ii) Evasão das defesas do hospedeiro, iii) multiplicação e iv) dano ao hospedeiro. A característica mais conservada entre as linhagens que causam doenças entéricas é sua habilidade de colonizar a mucosa intestinal, evitando assim o movimento peristáltico intestinal e competir com a flora estabelecida no intestino, incluindo-se aí outras linhagens de

E. coli. Sua via de transmissão geralmente se dá através de via oral-fecal, e por meio de água e alimentos contaminados, (BLANCO e BLANCO, 1993, NATARO e KAPER, 1998).

As *E.coli* possuem diferentes grupos antigênicos, que são caracterizados por diferentes combinações de antígenos O (antígenos lipopolissacarídicos somáticos constituintes da membrana externa da parede celular bacteriana), K (antígenos polissacarídicos presentes na cápsula) e H (antígenos protéicos flagelares), resultando em diversos sorotipos. A combinação específica de antígenos O e H define o “sorotipo” de um isolado, dessa forma *E. coli* de determinados sorogrupos podem ser associadas a certas síndromes clínicas mas, em geral, os antígenos sorológicos sozinhos não conferem virulência. Ao invés, os sorotipos e sorogrupos servem como marcadores identificáveis que podem ser correlacionados com certas linhagens virulentas.

Dos 181 sorogrupos (classificados pelo antígeno O) até hoje descritos para *E. coli* (*E. coli* Reference Center State University, Pennsylvania, EUA), aproximadamente 60 são reconhecidos como organismos patogênicos (DUNCAN e HACKNEY, 1994; MOLEND, J.R., 1994). Vários destes sorogrupos foram agrupados em 6 categorias, de acordo com as características clínicas observadas nas manifestações diarreicas, propriedades de virulência, tipo de interação com a mucosa intestinal, além de diferenças epidemiológicas apresentadas (REED, G.H., 1994, SALYERS e WHITT, 1994):

- *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC);
- *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC);
- *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC);

- *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC);
- *Escherichia coli* de Aderência Difusa (DAEC);
- *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC).

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

EPEC é uma categoria importante de *E. coli* diarreica que está associada com diarreia infantil e diarreia persistente em países em desenvolvimento, também está associada com doença em coelhos, bezerros, porcos e cães, contudo os sorogrupos encontrados nestes animais não costumam ser os encontrados em amostras humanas (NATARO e KAPER, 1998).

As infecções por EPEC são encontradas primariamente em crianças menores de 2 anos. Em crianças mais velhas, EPEC pode ser isolada também de indivíduos sadios. Em voluntários adultos, pode-se causar diarreia através da administração de um alto inóculo e neutralização do suco gástrico com íons bicarbonato. Não se sabe se a dose necessária para infectar crianças é menor mas presume-se que seja, em virtude da perda de receptores específicos em crianças mais velhas e adultos. (SALYERS e WHITT, 1994)

Como outras *E. coli* diarreioagênicas, a transmissão das EPEC se dá por via oral-fecal, através de mãos, utensílios, alimentos e água contaminados. O reservatório das EPEC se encontra em crianças doentes e sadias e adultos portadores assintomáticos. Em portadores sintomáticos, as EPEC podem ser isoladas das fezes até mesmo 2 semanas após o fim dos sintomas, (NATARO e KAPER, 1998).

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

Atualmente, propõe-se um modelo multifatorial hipotético para a patogenicidade das EPEC (DONNENBERG e KAPER, 1992). O primeiro estágio é a aderência localizada da bactéria às células epiteliais de uma maneira superficial “não-íntima”. O segundo estágio envolve a transdução de sinais nas células eucarióticas. O terceiro estágio resulta em uma adesão mais forte ou “íntima” da EPEC ao epitélio intestinal.

A adesão localizada é dependente de fatores contidos em um plasmídio de 60 kDa denominado EAF (de EPEC adherence factor) no qual encontra-se o gene *bfpA*, que codifica a fímbria denominada “bundling-forming pilus” (BFP ou pilus formador de feixes). Esta fímbria está envolvida na aderência entre bactérias durante a adesão localizada. Também contidos neste plasmídio estão os 3 genes *per* (de plasmid encoded regulator) que codificam proteínas que formam o complexo regulatório (Per) as quais ativam a transcrição de vários genes plasmídiais EAF e cromossômicos que são necessários para a patogênese das EPEC. (SEARS e KAPER, 1996)

A adesão das EPEC às células epiteliais induz uma série de transduções de sinal nas células eucarióticas. Os genes necessários estão localizados em uma região de 35 kb no cromossomo denominada LEE (locus of enterocyte effacement).

O conteúdo G+C desta região é cerca de 38%, contrastando com 50 a 51% do restante do genoma de *E. coli*, indicando que houve transferência lateral desta ilha de patogenicidade de uma outra espécie para as *E. coli* (NATARO e KAPER, 1998).

Dentro desta região estão os genes *espA*, *espB* e *espD*, que codificam proteínas secretórias que têm papel fundamental nas lesões A/E e que também estão relacionadas com alterações na permeabilidade intestinal, na atividade de excreção de íons e no acúmulo de cálcio no interior dos enterócitos, o que estimula as alterações no citoesqueleto que são características da lesão A/E (KRESSE e COL. 1999). Também encontram-se nesta região os genes *sep*, que são necessários para a expressão de um sistema que permite a secreção das proteínas EspA, EspB e EspD. Contudo, nenhum destes eventos de sinalização pode ser reproduzido utilizando-se apenas sobrenadantes de culturas de EPEC, indicando que a adesão da bactéria é fundamental para que ocorram estas alterações (NATARO e KAPER, 1998).

A formação da lesão A/E requer também a presença da intimina, uma proteína de membrana externa de 94 kDa, produto do gene *eae*, que promove a chamada “adesão íntima” da bactéria ao enterócito e da proteína secretada produzida pelo gene *espB*. Em estudos com voluntários, a infecção com linhagens que não possuíam o plasmídeo EAF ou o gene *eaeA* causava diarreia em apenas 20 a 36% dos casos, indicando a importância da colonização íntima e da formação da lesão A/E na estimulação da secreção intestinal (NATARO e KAPER, 1998).

Um possível mecanismo para a diarreia provocada por EPEC baseia-se no fato de que a destruição das microvilosidades pela lesão A/E causaria diminuição da absorção pelas células intestinais. No entanto, dada a rapidez com que se instala o

quadro diarréico, presume-se um papel maior das proteínas Esp. A diarréia causada por EPEC não é uma diarréia inflamatória clássica, mas tem sido relatada, através de biópsia, uma resposta inflamatória local, sugerindo que a resposta inflamatória pode também contribuir para a patogênese das EPEC (SEARS e KAPER, 1996; KAPER e COL. 1996).

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

EHEC, também conhecida como *E. coli* produtora da toxina “Shiga-like” (SLT ou Stx) ou Verotoxigênica (VT), produz uma variedade de síndromes clínicas, incluindo diarréia sangüinolenta e não sangüinolenta, colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica. O sítio primário de histopatologia em seres humanos é o cólon (SEARS e KAPER, 1996). Colite hemorrágica e diarréia em bezerros foram associadas com amostras produtoras de Stx (CHANTER e COL. 1986); uma variante das Stx, a Stx-IIv é responsável pela doença do edema (DE) em porcos (GANNON e GILES, 1990).

Em modelos animais, amostras de EHEC causam a mesma lesão Attaching-Effacing que é vista em EPEC. Da mesma forma que EPEC, as EHEC contém o locus LEE que é necessário para a histopatologia. Dessa forma, os mesmos mecanismos de secreção potenciais vistos em EPEC podem também desempenhar um papel na diarréia das EHEC. Contudo, além da lesão AE, amostras EHEC produzem uma ou mais toxinas de uma família de citotoxinas chamadas “Shiga-like toxin” (SLT ou Stx ou VT), que estão entre as mais potentes de todas as toxinas bacterianas. Estas toxinas são tidas como as responsáveis pelas características clínicas observadas durante as infecções por EHEC, em parte pela absorção local e

sistêmica das toxinas, resultando em dano ao endotélio vascular. Além disso há evidências de que a maioria das EHEC O157:H7 produz a enterotoxina EAST-I, que pode contribuir para a secreção intestinal nestas infecções (SEARS e KAPER, 1996).

A família das toxinas “Shiga” contém dois grupos denominados toxinas do tipo Shiga (Shiga-like toxins) – Stx-I ou SLT-I e Stx-II ou SLT-II, codificadas por bacteriófagos. A toxina Stx-I é essencialmente idêntica à toxina Shiga produzida pela *Shigella dysenteriae* do tipo I. A holotoxina Shiga contém uma única subunidade A de aproximadamente 32kDa associada com um pentâmero de subunidades B com 7,7 kDa cada. A subunidade B liga-se a um glicolípido da membrana, globotriaosilceramide ou Gb3. A subunidade A tem atividade N-glicosidase, que cliva um resíduo de adenina do RNA 28s que compõe o ribossomo eucariótico, resultando na inibição da síntese protéica, levando a célula intoxicada à morte (SEARS e KAPER, 1996).

As subunidades A e B das Stx-I e Stx-II são respectivamente 55% e 57% idênticas na sua seqüência prevista de aminoácidos. Existem variações entre a Stx-II e o subtipo Stx-IIv, que se liga preferencialmente ao Gb4.

A contribuição das Stx para a diarreia sangüinolenta e não sangüinolenta observadas nas EHEC é incerta, contudo observa-se acúmulo de fluído e danos histológicos em alças ligadas de coelhos. Em contraste, Stx administrada por via oral a coelhos recém-nascidos freqüentemente resulta em diarreia intensa e hemorrágica, danos ao cólon, com intensa infiltração neutrofílica. As Stx não têm efeito na secreção aniônica, mas diminuem a absorção basal de NaCl. Estes resultados sugerem que as Stx induzem a acumulação de fluído pela morte seletiva de células absorptivas das vilosidades, diminuindo desta forma a absorção de fluído e expondo a

secreção aniônica basal. Contudo, mesmo na ausência das Stx, a infecção pelas EHEC pode alterar o transporte de íons pelas células intestinais, sugerindo que a patogênese da secreção intestinal durante a infecção deve envolver outros fatores de virulência adicionais. Apesar de as EHEC possuírem a região LEE de EPEC, dados iniciais identificaram similaridades quanto ao desenvolvimento das lesões AE mas encontraram diferenças no grau em que estas lesões aparecem.

Conjuntamente, estes dados sugerem que pelo menos dois e possivelmente quatro, fatores de virulência essenciais têm papel nas infecções por EHEC: as Stx, os produtos bacterianos responsáveis pela lesão AE, EAST-I e um produto bacteriano ainda não identificado que promove o aumento dos níveis de cálcio intracelulares na ausência das lesões AE (NATARO e KAPER, 1998).

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

As infecções por EIEC são caracterizadas principalmente por diarreia aquosa, mas esporadicamente algumas linhagens causam disenteria. A capacidade destas linhagens de invadir células é conferida por genes de virulência presentes em um plasmídeo de 140MDs (*p/inv*) e a invasão provavelmente contribui para a doença disentérica. Ainda não se conhecem as causas da diarreia associada a estas linhagens, contudo certos estudos (FASANO e COL., 1990) demonstram que filtrados de cultura de EIEC, estimulam secreção moderada sem danos histológicos em alças ligadas de intestinos de coelhos. A atividade destes filtrados foi denominada EIET (de enterotoxina enteroinvasiva) mas ainda não pode ser associada a uma única proteína. Grande parte da atividade foi associada a uma toxina denominada ShET2 (de enterotoxina 2 de *Shigella flexneri*) codificada em um plasmídeo, além de uma

segunda toxina ainda não caracterizada. Além disso, linhagens de EIEC secretam uma citotoxina com peso molecular inferior a 30 kDa que possui pouca citotoxicidade em células Vero (rim de macaco verde africano) e cujo papel na patogenia das EIEC ainda é desconhecido (SEARS e KAPER, 1996).

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

Linhagens de EAEC estão associadas com a diarreia persistente em crianças pequenas principalmente em países em desenvolvimento. As linhagens de EAEC produzem três toxinas que são potencialmente capazes de estimular a secreção intestinal.

A enterotoxina EAST-I foi a primeira a ser descrita e é a melhor caracterizada de todas, é uma proteína de 4,1 kDa codificada pelo gene plasmidial *astA*. Apresenta cerca de 50% de homologia na seqüência de aminoácidos com a enterotoxina termo-estável do tipo I (ST-I) de ETEC, mas é distinta tanto geneticamente quanto antigenicamente da ST-I. EAST-I estimula o acúmulo de GMPc na mucosa intestinal (YAMAMOTO e ECHEVERRIA, 1996). Além das EAEC, a toxina EAST-I também foi associada com EHEC, ETEC e EPEC, sendo particularmente forte a associação encontrada entre esta toxina e amostras ETEC produtoras do fator de colonização K88 em amostras isoladas de leitões e com as linhagens ETEC de origem humana portadoras do fator de colonização CFA/II (BERTIN e COL. 1998).

A segunda toxina é uma proteína termo-lábil de 120 kDa que é imunologicamente relacionada com a hemolisina de *E. coli*. Esta toxina estimula aumento dos níveis de cálcio intracelulares, contribuindo para a patogenia por

interferir nos níveis de cálcio e, também, por causar poros na membrana dos enterócitos de maneira semelhante à hemolisina.

Recentemente sugeriu-se que EAEC secretam uma outra toxina capaz de estimular uma resposta inflamatória aguda em alças ligadas de ratos e em crianças infectadas. Esta toxina é uma proteína de 108 kDa que causa aumento na secreção intestinal e que, por ainda estar parcialmente purificada, desconhece-se o seu modo de atuação e a razão pela qual ocorre esta resposta inflamatória (SEARS e KAPER, 1996).

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

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

Vários estudos recentes incluem as DAEC como agentes de diarreia, enquanto outros estudos não isolaram mais amostras de casos de diarreia do que em controles assintomáticos. Uma possível explicação para isso está no fato de haver uma suscetibilidade dependente de idade, pois a quantidade de casos de diarreia por DAEC é maior em crianças mais velhas (4-5 anos) do que em bebês (1 ano). A maioria dos pacientes infectados com DAEC apresentavam diarreia aquosa com ausência de sangue ou leucócitos fecais (NATARO e KAPER, 1998).

Pouco se conhece das características patogênicas das DAEC, tem-se clonada e caracterizada uma fímbria destas linhagens que media o fenótipo DA. Os genes

que codificam esta fímbria (denominada F1845) podem ser encontrados tanto no cromossomo bacteriano como em um plasmídeo e cerca de 75% das amostras isoladas apresentam-se positivas quando testadas frente à uma sonda para este fator. Os genes fimbriais apresentam homologia com membros da família das adesinas bacterianas do grupo Dr, presentes em amostras de *E. coli* uropatogênicas. Devido à esta semelhança podem ocorrer resultados falso-positivos.

Também foi descrita uma proteína de membrana externa (OMP) de 100 kDa que está associada com o fenótipo DA, porém este fator é expresso somente por uma minoria dos isolados de DAEC (NATARO e KAPER, 1998).

As seis categorias de *E. coli* têm sido relacionadas com vários estudos de diarreia e são aceitas como possuidoras de características distintas. Contudo, outros estudos sugerem que podem haver outras categorias de *E. coli* diarreio gênicas bastante distintas das categorias descritas, sendo estas relacionadas com as seguintes toxinas de *Escherichia coli*:

Toxina Citoletal Distensora (CDT):

Sobrenadantes de culturas de amostras isoladas de casos esporádicos de gastroenterite em crianças apresentaram atividade citotóxica e alongamento celular culturas de células CHO (carcinoma de ovário de hamster) após 24 horas de incubação e distensão destas células com 96 e 120 horas de incubação. Extratos brutos desta toxina estimulam uma resposta eritematosa em pele de coelho mas não apresenta atividade secretora em ensaios de alça ligada em coelhos e em ensaios com camundongos recém-nascidos. A clonagem dos genes (*cdt*) para esta

toxina revela extensa heterogeneidade quando foram comparadas duas amostras diferentes produtoras desta toxina (SEARS e KAPER, 1996).

Fatores Necrosantes Citotóxicos (CNFs) :

Linhagens de *E. coli* produtoras dos CNFs têm sido classificadas como NTEC (de *E. coli* Necrotoxigênicas) e têm sido associadas a infecções extraintestinais (septicemia e infecções do trato urinário) e enterites em humanos e animais (BLANCO e BLANCO, 1993). Estas amostras, que são de sorogrupos bastante distintos produzem duas toxinas associadas, CNF-I e CNF-II, Dados sugerem que CNF-I é mais comum que CNF-II em infecções humanas e que amostras produtoras de ambos os fatores são isoladas de fezes normais e diarréicas de humanos e animais (BLANCO e COL.,1992). Apesar de os genes estruturais para estas toxinas serem altamente relacionados, codificando uma proteína de 115 kDa com 86% de similaridade e com 99% dos resíduos de aminoácidos conservados, elas diferem na localização destes genes, atividade biológica e são apenas parcialmente relacionadas em ensaios imunológicos. O gene que codifica o CNF-I (*cnf1*) é cromossômico e altamente associado com o gene da hemolisina; o gene para o CNF-II (*cnf2*) está localizado em um plasmídeo Vir ou F. Com base na análise genética, ambas as toxinas mostram uma homologia significativa com a toxina de *Pasteurella multocida* que desempenha papel importante na patogênese da rinite progressiva em porcos (SEARS e KAPER, 1996).

Características apresentadas pelos CNF-I e CNF-II são a habilidade de causar dermonecrose em pele de coelho e multinucleação em diversas linhagens celulares (p.ex. HeLa, HEp-2, Vero). Contudo, CNF-II é cerca de 100 vezes mais potente que

CNF-I em ensaios em pele de coelho, e o padrão de alteração morfológica é diferente em células HeLa (carcinoma de útero humano). Em geral, CNF-II é mais necrótico e letal que CNF-I em certos ensaios biológicos e, diferente do CNF-I, causa secreção em alça ligada após 24 horas na maioria dos coelhos testados (BLANCO e BLANCO, 1993).

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

potencialmente capazes de exercer efeitos toxêmicos sérios (SEARS e KAPER, 1996).

No nível celular, os efeitos exercidos pelos CNFs no citoesqueleto podem ser relevantes para a patogenicidade das linhagens portadoras deste fator, primeiro por induzir essas alterações no citoesqueleto e também pela capacidade dos CNF de induzir a célula eucariótica a “ingerir” quaisquer partículas em contato com a membrana celular, tais como “bolas” de látex e/ou bactérias, a aquisição desta capacidade requer exposição aos CNFs por pelo menos 48 horas. Esta correlação pode ser interpretada como uma estratégia do patógeno de induzir um prolongado estado de fagocitose nas células epiteliais, permitindo a multiplicação bacteriana e até mesmo a transcitose (De RYCKE e COL. 1999). Apesar disso não existem dados disponíveis a ligando CNF-I e CNF-II à patofisiologia intestinal.

***Escherichia coli* Enterotoxigênicas (ETEC):**

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

Linhagens de ETEC foram primeiro reconhecidas como causadoras de diarreia em leitões, e também podem causar infecções letais aos animais recém nascidos. Estes estudos das ETEC em leitões foram os primeiros a elucidar os mecanismos da doença, incluído a existência de duas enterotoxinas codificadas por genes plasmidiais. As primeiras descrições de ETEC em humanos relatam certos isolados de fezes de crianças com diarreia que eram capazes de causar acúmulo de líquido em alças ligadas de coelhos (NATARO e KAPER, 1998).

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

A adesão do microrganismo constitui o primeiro passo na maioria das infecções bacterianas, esta aderência não é um fenômeno aleatório, trata-se de uma associação específica na qual ocorre um reconhecimento mútuo entre o patógeno e as células do hospedeiro. Este reconhecimento é possível graças à existência de determinadas estruturas na superfície bacteriana que facilitam a ligação entre a bactéria e receptores na célula hospedeira mediante uma interação do tipo chave-fechadura (BLANCO e COL., 1993).

Esta interação permite às ETEC colonizar e proliferar na mucosa intestinal do hospedeiro, evitando a ação de arraste do peristaltismo intestinal. A adesão está associada à presença de filamentos protéicos expressos por toda a superfície bacteriana, tais filamentos, também denominados Fatores de Colonização (FCs)

consistem em estruturas rígidas (fímbrias) ou flexíveis (fibrilas), compostas por subunidades protéicas e imunogênicas.

Estes organismos produzem enterotoxinas termo-estáveis e termo-lábeis (ST e LT, respectivamente), que estão entre as toxinas bacterianas melhor caracterizadas. ST-I está associada com doença em humanos e animais e ST-II está associada primariamente com diarreia em leitões, contudo os genes para ST-II (*estB*) estão presentes em algumas amostras de ETEC isoladas de bovinos, galinhas e mesmo amostras de origem humana. LT-I está associada com doenças tanto em humanos quanto em animais enquanto LT-II tem sido encontrada apenas em animais, ainda sem relação com doença (DUBREIL, J.D. 1997).

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

Apesar de algumas infecções por ETEC produtoras de LT-I, se assemelharem à cólera em severidade, a maioria das infecções por elas causada geralmente é mais branda e de curta duração quando comparadas às infecções ocasionadas pelo *V. cholerae* expressando a toxina colérica. O mecanismo pelo qual ambas causam diarreia está associado a ativação de adenilato ciclase nas células da mucosa

intestinal, o que resulta em aumento dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), que por sua vez aumenta a secreção de ânions e fluídos para o lúmen intestinal (GYLES C., 1992).

Um mecanismo alternativo seria a síntese de prostaglandinas da série E (PGE_1 e PGE_2) que atuam estimulando a motilidade intestinal e o transporte de eletrólitos. Um segundo mecanismo alternativo envolve a estimulação do Sistema Nervoso Entérico (ENS), que regula a secreção de íons e também a motilidade intestinal. A serotonina e o polipeptídeo vasoativo intestinal, que podem estimular a secreção das células epiteliais intestinais via ENS são liberados no intestino delgado após tratamento com a toxina colérica.

Um terceiro mecanismo potencial poderia envolver uma leve resposta inflamatória intestinal à presença da LT ou CT, pois sabe-se que CT estimula a produção de interleucina-6, que ativaria o sistema imune entérico e, potencialmente desencadeiaria a geração de metabólitos que também poderiam estimular a secreção intestinal (NATARO e KAPER 1998).

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

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

Enterotoxina termo-estável do tipo I (ST-I ou ST-a): é um peptídeo maduro de 18 aminoácidos com massa molecular de 2 kDa, não imunogênico e codificado pelo gene *estA* associado a um transposon e está localizado em um plasmídeo. ST-I atua ligando-se à guanilato ciclase, um receptor epitelial presente nas células da bordadura em escova. Estes receptores encontram-se distribuídos por todo intestino delgado e cólon de humanos, sendo que a presença destes receptores decresce de acordo com o eixo longitudinal do intestino. O tamanho e a natureza do receptor para ST-I tem sido alvo de extensa investigação, resultando na identificação de pelo menos um receptor definitivo, a guanilato ciclase C (GC-C), presente na membrana apical das células epiteliais intestinais.

Um hormônio de mamíferos, a guanilina atua como agonista da guanilato ciclase e presume-se que tenha um papel na homeostase do intestino e este receptor é oportunisticamente utilizado pela ST-I para causar diarreia.

Após a ligação da ST-I, GC-C é ativado, resultando em aumento dos níveis de GMPc intracelulares que estimulam a secreção de cloreto e a inibição da absorção de NaCl, resultando em alta secreção de fluídos (SEARS e KAPER, 1996).

Enterotoxina termo-estável do tipo II (ST-II OU ST-b): O gene plasmidial *estB* codifica um peptídeo maduro de 48 aminoácidos. Ainda não se conhece o receptor intestinal para ST-II e nem mesmo o domínio tóxico foi caracterizado.

Diferente da ST-I, a ST-II induz danos histológicos no epitélio intestinal causando perda das células das vilosidades e atrofia parcial nos vilos. Seu mecanismo de ação ainda é desconhecido, mas sabe-se que não envolve nucleotídeos cíclicos aparentemente a secreção causada pela ST-II é a do ânion bicarbonato, ao invés do cloreto, estimulado pela ST-I. (DUBREIL, J.D. 1997).

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

Fatores de colonização:

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

Dentre estes, o CS31A (CS de "coli-surface associated"), relacionado com *Escherichia coli* enterotoxigênica ainda não consta na literatura como presente no Brasil, sendo descrito na França, Canadá, Índia e Japão (CONTREPOIS e COL., 1989; SHIMIZU e COL., 1987). Mais recentemente, JALLAT e COL., 1994 isolaram o CS31A de amostras de seres humanos com diarreia.

GIRARDEAU e COL., em 1988, isolaram e purificaram esta adesina e, de acordo com estudos de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (EGPA-SDS) verificou-se que as subunidades deste FC apresentam um peso aparente ao redor de

29.000 Daltons. Este FC, a princípio, foi considerado como um tipo de antígeno capsular, mas posteriormente verificou-se que esta “zona capsular” estava relacionada com a abundância de muitas fibrilas, dispostas sem ordem aparente ao redor da célula, Dessa forma o CS31A claramente difere da estrutura típica apresentada pelas fímbrias, lembrando mais a estrutura de adesinas presentes em cápsulas e das adesinas não fimbriais descritas para *E. coli* uropatogênica.

Análise da sua seqüência de aminoácidos na região N-terminal revelou grande homologia com o antígeno K88 e uma homologia mais distante com o F41, colocando o CS31A como pertencente a esta família de fímbrias. Sua homologia com o K88 e o F41 se estende até o nível das proteínas acessórias, muitas das quais são inteiramente homólogas (GIRARDEAU e COL., 1991).

Sabe-se que amostras portadoras de mais de um FC são bastante freqüentes (CONTREPOIS e COL., 1989 e SHIMIZU e COL., 1987), e que infecções experimentais realizadas com linhagens portadoras de mais de um FC (K99+, F17+ e CS31A+) ou infecção com duas ou mais linhagens produtoras dos FCs individualmente, demonstraram que a diarreia resultante é muito mais severa (SHIMIZU e COL. 1987).

Em 1991, ESPINASSE e COL. relacionaram o CS31A com uma nova síndrome diarreica, na qual ataxia e astenia são os sinais clínicos predominantes, contudo, desidratação é raramente observada, e nestes casos, o CS31A aparecia relacionado à Colicina V.

Os sorogrupos aos quais o CS31A aparece associado são: O8, O9, O17, O20, O23, O78, O87, O117, O134, O157, O161 (BLANCO e BLANCO, 1993).

Estudos utilizando linhagens de laboratório de *E. coli* (HB101) que expressam o CS31A revelaram que ele é capaz de promover adesão em culturas de células Int 407 e HL, pertencentes ao epitélio intestinal (KORTH e COL., 1991). Entretanto, quando uma amostra de campo isolada de septicemia em bovinos foi testada para verificar sua capacidade de invadir culturas de células de rim canino Madin-Darby (MDKC), sua capacidade de invasão foi semelhante à de uma linhagem mutante que era deficiente para o CS31A, enquanto uma linhagem de laboratório DH5 α que expressava o CS31A não foi capaz de promover a invasão das células MDKC, sugerindo que outros fatores poderiam estar associados ao CS31A para que estas amostras possam causar septicemia (KORTH e COL. 1994).

ADAMS e COL., em 1997, associaram o CS31A com uma nova proteína de 32 kDa expressa por linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas para coelhos na Austrália, nas quais o “operon” responsável pela expressão desta proteína é bastante similar ao “operon” *fae* da fímbria K88 e do “operon” *clp* do CS31A.

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

Em 1998, BERTIN e COL. relatam que o CS31A apresenta adesão ao receptor N-acetilneuramínico presente nas células Int 407 humanas e encontraram em 56 amostras produtoras do CNF-I uma alta porcentagem de amostras produtoras do CS31A (71% no total) e das amostras CS31A positivas, grande parte era produtora da enterotoxina termo-estável do tipo I de *Escherichia coli*

enteroagregativa (EAST-I), demonstrando novas associações entre diversos fatores de virulência.

Assim este trabalho teve por objetivos, verificar se o CS31A ocorre em amostras de *E. coli* isoladas de bovinos no Brasil, estudando sua frequência, associação com outros FCs e toxinas. Para tanto utilizamos metodologia convencional (ensaios biológicos) e moleculares (amplificação de ácido nucléico - PCR).

2 - OBJETIVOS:

Este estudo teve por objetivos verificar a frequência em que ocorre o FC CS31A em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerras com diarreia no Brasil, bem como sua eventual associação com outros fatores de virulência, a saber:

Fatores de Colonização:

F5 (K99);

F17;

F41;

F165;

Toxinas bacterianas:

Enterotoxina termo-estável do tipo I (ST-I);

“Shiga-like toxins” do tipo I e II (Stx-I e Stx-II);

Fator Necrosante Citotóxico do tipo I e II (CNF-I e CNF-II);

Toxina termo-estável de *E. coli* Enteroagregativa (EAST-I).

Determinar os sorogrupos prevalentes nas amostras CS31A positivas.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1- AMOSTRAS BACTERIANAS:

3.1.1 - Amostras Padrão:

Como amostras controle, foram utilizadas amostras produtoras de fatores de colonização e citotoxinas abaixo relacionadas:

B41M^a - O101:K-:F41+, produtora do F41;

ATT25^a, produtora do F17-a;

F82^b - O101: K-:K99+, produtora do F5 (K99) e da ST-I;

31 A^c, produtora do CS31A e do F17-c;

4787^d - O115:K0165:F165+, produtora do F165;

O157:H7^a e H30^a, produtoras de "Shiga-like toxins" Stx-I e Stx-II, respectivamente;

MR48^e (O75:K95) e B26a^e (O123:H16) produtoras do Fator Necrosante Citotóxico do tipo I (CNF-I) e II (CNF-II), respectivamente.

O42^a – O42:H12, produtora da toxina termo-estável do tipo I de *Escherichia coli* Enteroagregativa – EAEC - (EAST-1);

DH5 α ^a, como controle negativo.

a – amostras pertencente à Bacterioteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, UNICAMP.

b – amostra cedida por A. E. Parma, do Laboratório de Imunoquímica e Biotecnologia, Fac. Cs. Veterinárias, Univ. Nac. del Centro, Tandil, Argentina.

c – amostra cedida por M. Contrepolis, Lab de Microbiologie, INRA, Ceyrat, França.

d – amostra cedida por J.M. Fairbrother, GREMIP Fac. de Med. Veterinária, Univ. de Montreal, Québec, Canadá.

e – amostras cedidas por J. Balnco, LREC, Fac. de Veterinária, Univ. de Santiago de Compostela, Campus Lugo, Espanha.

3.1.2 – Amostras de Campo:

Todas as amostras de *Escherichia coli* utilizadas neste estudo são provenientes da Bacterioteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP. Foram estudadas 255 amostras bacterianas isoladas de bezerros com diarreia (com idades variando entre 1 dia a 12 semanas).

3.2 DETECÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA POR ENSAIOS BIOLÓGICOS:

3.2.1. DETECÇÃO DOS FATORES DE COLONIZAÇÃO (FCs):

As amostras de *E.coli* foram cultivadas em meio de Minca (GUINÉE e COL. 1977) sendo a detecção realizada através de aglutinação em lâmina, utilizando-se antissoros específicos para os diversos fatores de colonização (CS31A, F5 (K99), F17, F41, F165) disponíveis na soroteca do Laboratório de Antígenos Bacterianos II – DMI , IB, UNICAMP - presentes em amostras de *E.coli* de origem bovina. Todas as amostras foram testadas frente à solução salina por cerca de 3 minutos a fim de verificar se elas apresentavam aglutinação espontânea, o que

caracteriza o fenótipo "Rugoso". As amostras que apresentaram este fenótipo não foram mais empregadas nos ensaios subseqüentes.

Uma pequena quantidade do crescimento bacteriano foi suspensa em salina tamponada com fosfato (PBS). A uma gota dessa suspensão foram adicionados 20 μ L dos antissoros diluídos; o teste foi primeiramente realizado frente ao antissoro anti-CS31A; apenas as amostras consideradas positivas para este fator foram empregadas em reações frente aos outros antissoros.

3.2.2 – DETECÇÃO DE TOXINAS:

A) CULTIVO DAS AMOSTRAS E OBTENÇÃO DAS TOXINAS:

As amostras de *E. coli* foram cultivadas em meio CAYE (EVANS e COL. 1973) e incubadas a 37^oC sob agitação (150 rpm) por 18 horas. Após o período de crescimento, as culturas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 40 min., os sobrenadantes foram coletados e mantidos a 4^oC até realização dos ensaios.

B) ENSAIO PARA VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENTEROTOXINA TERMO-ESTÁVEL DO TIPO I (ST-I):

O método realizado para detecção da produção da toxina ST-I foi o método do camundongo recém-nascido ou teste de Dean (DEAN e COL., 1973).

Em 1 mL do sobrenadante resultante de cada cultura foi adicionada uma gota da solução de Azul de Evans a 2%. Em seguida, 0,1 mL desta mistura foi inoculado em cada camundongo recém-nascido (3-4 dias) por via intragástrica ou oral. Para cada uma das amostras estudadas foi inoculado um grupo de 3 animais, sendo estes mantidos à temperatura ambiente por 4 horas, em seguida sacrificados com éter e seus intestinos removidos. Os intestinos e carcaças de cada

grupo foram pesados separadamente e, pelos valores obtidos na pesagem, foi estabelecida a relação entre peso do intestino/peso da carcaça. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram relação com valor maior ou igual a 0,085.

C) DETECÇÃO DE “SHIGA-LIKE TOXINS” (Stx) E DO FATORES NECROSANTE CITOTÓXICO (CNF):

A detecção biológica destas toxinas foi realizada em um estudo prévio utilizando linhagens celulares Vero (rim de macaco verde africano) e HeLa (carcinoma de útero humano) (SALVADORI e COL. 1997).

3.4 - DETERMINAÇÃO DO ANTÍGENO “O”:

A metodologia empregada foi proposta pelo Laboratório de Referência de *Escherichia coli* (LREC) da Universidade de Santiago de Compostela – Campus de Lugo – Espanha, e está baseada em GUINÉE e COL. (1972) modificada por BLANCO e COL. (1992) e BLANCO e COL. (1996a).

3.4.1 - PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA:

As amostras de *E. coli* foram cultivadas em ágar de tripton-soja (TSA) e incubadas por 18 horas a 37°C. Após este período, as células foram suspensas em 2 mL de solução salina, ajustando-se a concentração bacteriana ao número 6 da escala de sulfato de bário de McFarland ($1,8 \times 10^9$ bactérias por mL).

As suspensões foram subdivididos em 2 grupos:

a) Para se verificar a presença dos grupos O8, O9, O20 e O101, as suspensões foram autoclavadas a 121°C por 2,5 horas para inativar o antígeno K e

desmascarar o antígeno O. Após o resfriamento, a cada tubo foi adicionado igual volume de salina formalinizada contendo violeta genciana (0,005%, p/v).

b) Para os demais grupos as suspensões foram aquecidas a 100°C em banho-maria por 1 hora, após o resfriamento também foi adicionado igual volume de solução salina formalinizada com violeta genciana (0,005%, p/v).

As suspensões bacterianas que sedimentaram após o tratamento térmico foram consideradas rugosas, impróprias para uso neste experimento.

3.4.2 - SOROAGLUTINAÇÃO EM PLACA:

Em placas de microtítulação com fundo em V foram adicionados 50 µL da suspensão bacteriana e 50µL do soro diluído; as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 horas. Após este período, foi realizada a leitura das placas:

Foram consideradas positivas as reações onde formou-se uma retícula azulada e não se observou precipitação das bactérias. Onde não houve aglutinação e foi observada acumulação de bactérias formando um precipitado azul considerou-se o resultado como negativo; no entanto, quando uma determinada amostra mostrava-se reativa frente a mais de um antissoro era classificada como “Não Determinado”.

As amostras bacterianas CS31A positivas foram testadas frente aos 167 antissoros monoespecíficos para cada sorogrupo contidos no “kit” adquirido do LREC da Universidade de Santiago de Compostela.

3.5 - ENSAIOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA:

3.5.1 - ESCOLHA DOS INICIADORES PARA O FC CS31A:

Com base na seqüência do gene *clpG* que codifica a subunidade do CS31A descrita por KORTH e COL., 1991; GIRARDEAU e COL., 1991 [Figura 1], e na comparação entre as seqüências que codificam as subunidades do K88 e do F41 (GIRARDEAU e COL. 1991), selecionamos duas regiões que não apresentassem homologia aos outros FCs [Figura 2].

FIGURA 1: Seqüência do gene *clpG*, que codifica a subunidade principal do CS31A, baseado em KORTH e COL. (1991) e GIRARDEAU e COL. (1991).

| | | | | | | |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|------------|
| 01 | CGATTTATTA | TTTGTGAAAT | ATAAAGGAAT | TTATTTTATG | AAAAAGACTC | TGATTGCACT |
| 61 | GGCTGTGGCT | GTTTCGGCAG | TATCAGGTGC | GGCGCATGCG | TGGACCACTG | GTGATTTTAA |
| 121 | TGGTTCATTT | GATATGAATG | GCACAATTAC | TGCTGATGCG | TATAAAGACA | AATGGGAATG |
| 181 | GATGGTTGGG | GGCGCTCTCT | CCTTCAACAA | CACTATCAAG | GAAATGACAG | GTGACAGTAA |
| 241 | GCTGCTGACC | ATCACTCAGT | CTGAACCAGC | TCCTATTCTT | TTAGGGCGCA | CAAAAGAGGC |
| 301 | GTTTGCAGCA | TCGATTGTTG | GTGTTGGTGC | AATTCCTTTA | ATTGCGTTCA | GTGATTATGA |
| 361 | AGGGAAAGGA | GTTGCCTTAC | AGAGTTCCTG | GGATAACGGT | AAGGGGTTCT | TTGAATTGCC |
| 421 | CATGAAAGAT | GATAGTGGAA | ATAATCTCGG | TAGCGTAAAA | GTTAATGTTA | CTTCTGCTGG |
| 481 | CCTGTTTTCC | TATAGTGAAA | TATCAACAGG | TTTAGTTGGT | ATAACTTCTG | TTGCCAGTGG |
| 541 | CGATAATACA | AGTATTTATT | ATGGTGGTCT | GGTGTGCGCA | GCAATTAGGG | CGGGTAAAGA |
| 601 | CGCAGCATCA | GCTGTGTCGA | AATTTGGCAA | CTATAATCAT | ACACAATTGC | TGGGCCAGCT |
| 661 | TCAAGCAGTA | AACCCTAACG | CGGGCAATAG | AGGACAAGTA | AATAAAAATA | GTGCGGTCTC |
| 721 | ACAAAATATG | GTGATGACTA | CTGGTGATGT | AATTCATCC | TCTTACGCAC | TTGGTATTGA |
| 781 | CCAGGGACAG | ACTATTGAAG | CAACCTTTAC | TAATCCTGTG | GTTAGCACCA | CCCAGTGGAG |
| 841 | TGCTCCGCTG | AACGTGGCAG | TAACCTTATAA | CTAATTTGGCT | TGACAATTTG | TCAGCCTGTA |

Em destaque estão indicadas as regiões onde deve haver alinhamento dos iniciadores para o CS31A.

Figura 2: Comparação das seqüências de aminoácidos das subunidades das adesinas CS31A, K88 e F41, com base em GIRARDEAU e COL. (1991).



Em destaque estão indicados os sítios onde, no gene, devem se alinhar os iniciadores escolhidos. Espaços foram inseridos entre os aminoácidos de modo a se obter máximo alinhamento entre as seqüências.

Com isso foram “eleitas” as seguintes seqüências:

FC CS31A –1 - 5'-**GGC CTG TTT TCC TAT AGT**-3' (Na fita codante)

FC CS31A –2 - 5'-**TAC TTG TCC TCT ATT GCC**-3' (Na fita complementar)

Com produto esperado no processo de amplificação, de 221 pares de bases e, de acordo com a fórmula proposta por OJENIYI e COL. (1994) descrita no Item 3.7 a temperatura de anelamento para este par de iniciadores é de 52°C, porém foi utilizada a temperatura de 56°C em virtude de terem sido obtidos melhores resultados nos ensaios.

3.5.2 - OBTENÇÃO DO DNA BACTERIANO:

Foi utilizado o protocolo descrito por Van SOOLINGEN e COL.(1993). Neste método as amostras bacterianas foram cultivadas em tubos com 4 mL de infusão de Cérebro e Coração - BHI - a 37°C por 24 horas; após isso as células foram centrifugadas a 12.000 rpm por 2 min, sendo posteriormente descartado o sobrenadante.

Ao “pellet” foram adicionados 500µL de tampão Tris-EDTA (10mM de Tris-HCl 1 M + 1 mM de EDTA 0,5 M) pH 8,0 para lavagem das células e estas novamente suspensas em 400µL deste tampão. A esta suspensão foram adicionados 40µL de lisozima (10mg/mL) para que fosse rompida a parede celular e 10µL de RNase(10mg/mL), para a degradação do mRNA presente nas células, após isso a mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C durante a noite.

Após este período foram adicionados 75 μ L de uma solução SDS+Proteinase K (70 μ L de SDS 10% + 5 μ L de Proteinase K – 10 mg/mL), para romper os esferoplastos e digerir as endonucleases (DNAses e RNAses) presentes na mistura. A suspensão foi novamente homogeneizada e incubada a 65 $^{\circ}$ C por 10 min. Em seguida acrescentaram-se 100 μ L de NaCl 5M e 100 μ L de solução CTAB/NaCl (10,0g/4,1g em 100 mL), para que fossem degradados os possíveis complexos de proteínas e membranas existentes. A mistura foi agitada com “vortex” até que o líquido tomasse um aspecto leitoso, sendo incubada a 65 $^{\circ}$ C por mais 10 minutos. Depois desse período, foram adicionados 750 μ L da mistura clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1) para que o ácido nucléico fosse separado das proteínas que foram precipitadas na fase orgânica. Em seguida a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 12.000 rpm por 5 min.

O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo e a ele foram adicionados 450 μ L de isopropanol para precipitação do ácido nucléico; em seguida a mistura foi colocada a -20 $^{\circ}$ C por 30 min.

Após este período, a solução foi novamente centrifugada, o sobrenadante descartado e adicionado 1 mL de etanol a 70%, e a suspensão colocada novamente a -20 $^{\circ}$ C por 30 minutos. Posteriormente, centrifugadas e o precipitado foi posto para secar em estufa a 37 $^{\circ}$ C até que o etanol residual fosse evaporado. Em seguida o sedimento foi suspenso em 100 μ L de tampão T.E.(pH 8,0) e estocado a -20 $^{\circ}$ C.

A concentração de DNA foi determinada através leitura em espectrofotômetro, segundo SAMBROOK e COL. (1989) nos comprimento de onda

260 e 280 nm, onde $[DNA] \mu g/mL = \lambda_{260} \times diluição(1:100) \times 50$. Para determinação do grau de pureza do DNA verificou-se a relação entre a absorbância $\lambda_{260}/\lambda_{280}$. Onde o resultado esperado era de 1,5 a 2,0 significando não haver contaminação por RNA e/ou proteínas.

3.5.3 – ENSAIOS DE REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR):

Iniciadores utilizados na avaliação da presença dos genes para os Fatores de Colonização:

| PRIMER FCs ¹ | SEQÜÊNCIAS | T.A.* | P.A.** | REFERÊNCIA. |
|-------------------------|--|-------|--------|---------------------------|
| CS31A | 5'-GGCCTGTTTTCTATAGT-3' 5'-TACTTGTCTCTATTGCC-3' | 52°C | 221 pb | Este estudo |
| ClpG (CS31A) | 5'-GGGCGCTCTCTCCTTCAAC-3' 5'-CGCCCTAATTGCTGGCGAC-3' | 57°C | 402 pb | BERTIN e COL., (1998) |
| F17 | 5'-GCAGAAAATTCAATTTATCCTTGG-3' 5'-CTGATAAGCGATGGTGTAATTAAC-3' | 65°C | 537 pb | BERTIN e COL., (1996) |
| K99 | 5'-TGGGACTACCAATGCTTCTG-3' 5'-TATCCACCATTAGACGGAGC-3' | 60°C | 450 pb | ROOSENDAAL e COL., (1984) |
| F41 | 5'-GAGGGACTTTTCATCTTTTAG-3' 5'-AGTCCATTCCATTTATAGGC-3' | 56°C | 431 pb | FIDOCK e COL., (1989) |

1 – Fatores de colonização.

* -Temperatura de Anelamento de cada par de iniciadores, foi calculada usando a fórmula $T.A.=4(G+C) + 2(A+T)$, OJENIYI e COL. (1994).

** - Produto Amplificado para cada par de iniciadores.

Iniciadores utilizados na avaliação da presença dos genes para toxinas:

| PRIMER Toxinas | SEQÜÊNCIAS | T.A.* | P.A.** | REFERÊNCIA. |
|---------------------------|--|--------------|---------------|----------------------------|
| ST-I | 5'-TCCGTGAAACAACATGACGG-3' 5'-ATAACATCCAGCACAGGCAG-3' | 60°C | 244 pb | SO e McCARTY, (1980) |
| CNFs | 5'-CTGGAGTCGAGGTGGTGG-3' 5'-CTCCTGTCAACCACAGCC-3' | 56°C | 533 pb | BLANCO e COL., (1996b) |
| CNF-I | 5'-GAACTTATTAAGGATAGT-3' 5'-CATTATTTATAACGCTG-3' | 45°C | 543 pb | BLANCO e COL., (1996b) |
| CNF-II | 5'-AATCTAATTAAGAGAAC-3' 5'-CATGCTTTGTATATCTA-3' | 44°C | 543 pb | BLANCO e COL., (1996b) |
| EAST-I | 5'-CCATCAACACAGTATATCCGA-3' 5'-GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT-3' | 55°C | 111 pb | YAMAMOTO e COL., (1996) |
| SLT-I | 5'-AGGTTGCAGCTCTCTTTGAATA-3' 5'-TGCAAACAAATTATCCCCTGAG-3' | 57°C | 364 pb | JACKSON e COL., (1988) |
| SLT-II | 5'-GGGCAGTTATTTTGCTGTGGA-3' 5'-GTATCTGCCTGAAGCGTAA-3' | 59°C | 386 pb | JACKSON e COL., (1987) |

* -Temperatura de Anelamento de cada par de iniciadores, foi calculada usando a fórmula $T.A.=4(G+C) + 2(A+T)$, OJENIYI e COL. (1994).

** - Produto Amplificado para cada par de iniciadores.

Para as reações de amplificação, o protocolo que mostrou-se mais adequado foi o descrito por BLANCO e COL. (1997), com algumas modificações, baseadas em INNIS e COL. (1990).

Assim, para um volume total de reação de 50 μ L, foram utilizados:

5 μ L de tampão 10x (200 mM Tris-HCl – pH 8,0; 500mM de KCl);

3 μ L de MgCl₂ (1,5 mM);

1 μ L de dNTPs (50 μ M de cada);

1 μ L de cada um dos iniciadores (20 pmol de cada);

2 μ L do DNA extraído (DNA total) (50 a 200 ng);

1 U da Enzima Taq DNA polymerase (Gibco -Life Technologies)

em concentração de 0,5 U por μ L;

água Milli-Q esterilizada (q.s.p. 50 μ L).

As amostras foram amplificadas após uma etapa inicial de aquecimento a 94^oC por 10 min. A seguir a temperatura foi mantida a 60^oC até que fosse adicionada a enzima e então foram realizados 30 ciclos (em Termociclador GeneAmp PCR System 9700 Perkin Elmer Inc. EUA) descritos a seguir:

1 minuto a 94^oC (Fase de Desnaturação);

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

2 minutos a 72^oC (Fase de Extensão).

Após este período, as reações permaneceram a 72^oC por mais 10 minutos para um período de extensão final.

3.5.4 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE:

Após o período de amplificação, a uma alíquota de 10 μ L de cada reação foram adicionados 5 μ L do tampão de ressuspensão de amostra (0,25% de Azul de Bromofenol; 0,25% de Xileno Cianol e 40% de sacarose p/v em água deionizada) para ser analisada pelo sistema de eletroforese horizontal submersa (SAMBROOK e COL. 1989), em gel de agarose em concentração de 2,0%. Um padrão de peso molecular (100 bp DNA Ladder - Promega) de 100 a 1500 pb foi incluído em cada gel. Para visualização, a banda com maior intensidade, no padrão, tem 500 pb e a banda superior em cada um possui 1500 pb.

Inicialmente foi aplicada uma voltagem de 30V até que todo o corante azul penetrasse o gel; após isso a voltagem foi elevada para 100 V até que o azul de migração mais rápido (Xileno Cianol) tivesse percorrido 2/3 do gel.

Após o término da corrida, o gel foi transferido para uma cuba contendo solução de 0,01 mg/mL de brometo de etídio para que as bandas de DNA fossem coradas e posteriormente visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta.

Para registro, os géis foram fotografados através do sistema ImageMaster VDS (Amersham Pharmacia Biotech Inc. EUA)

4-RESULTADOS:

4.1- ENSAIOS DE SOROAGLUTINAÇÃO FRENTE AO ANTÍSSORO ANTI-CS31A:

As 255 amostras de *E. coli* de origem bovina utilizadas neste estudo foram inicialmente avaliadas frente à solução salina para a verificação do fenótipo “rugoso” e as que não apresentaram esta característica foram testadas frente ao antissoro monoespecífico contra o FC CS31A. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 1, pág. 37 onde a identificação das amostras mantém a nomenclatura original, de acordo com o que foi empregado pelos coletores no campo, nela estão relacionadas todas as amostras estudadas, levando-se em conta apenas sua relação com o CS31A e o fenótipo rugoso.

Verificamos portanto que 98 amostras (38,43%) foram reconhecidas pelo antissoro anti-CS31A (Figura 3). Observamos também a ocorrência de 18 (7,05%) amostras rugosas (instáveis em salina).

TABELA 1: VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO CS31A EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli* DE ORIGEM BOVINA, DETERMINADO POR ENSAIO DE SOROAGLUTINAÇÃO.

| AMOSTRA | CS31A | AMOSTRA | CS31A |
|---------|----------|-----------|----------|
| 25(1) | Negativo | 108(4) | Positivo |
| 25(2) | Negativo | 109(3) | Negativo |
| 50(2) | Positivo | 109(4) | Positivo |
| 50(3) | Positivo | 110(3) | Rugosa |
| 50(5) | Negativo | 110(4) | Negativo |
| 51(A) | Negativo | 110(5) | Negativo |
| 51(B) | Negativo | 111(1) | Rugosa |
| 52(1) | Negativo | 111(2) | Positivo |
| 52(2) | Negativo | 111(3) | Positivo |
| 52(3) | Negativo | 111(4) | Negativo |
| 52(4) | Negativo | 118(1) | Negativo |
| 54(1) | Negativo | 300(C-1) | Rugosa |
| 54(2) | Positivo | 301(C-1) | Positivo |
| 54(3) | Negativo | 301(C-2) | Positivo |
| 54(5) | Positivo | 302(C-1) | Negativo |
| 54(6) | Negativo | 304(C-1) | Positivo |
| 57(B-1) | Positivo | 304(C-2) | Positivo |
| 83(3) | Positivo | 306(C-1) | Positivo |
| 83(5) | Negativo | 306(C-2) | Positivo |
| 86 | Positivo | 307(C-1) | Negativo |
| 86(4) | Positivo | 400(C-1) | Rugosa |
| 87(1) | Negativo | 400(C-2) | Negativo |
| 87(2) | Negativo | 402(C-1) | Negativo |
| 87(3) | Positivo | 402(C-2) | Negativo |
| 88(6) | Positivo | 403(C-1) | Positivo |
| 90(2) | Positivo | 403(C-2) | Positivo |
| 90(3) | Negativo | 404(C-1) | Positivo |
| 90(5) | Positivo | 404(C-2) | Positivo |
| 92(1) | Positivo | 405(C-1) | Positivo |
| 92(2) | Positivo | 405(C-2) | Negativo |
| 93(1) | Positivo | 406(C-1) | Negativo |
| 93(4) | Positivo | 406(C-2) | Negativo |
| 94(1) | Negativo | 407(C-1) | Positivo |
| 94(2) | Positivo | 407(C-2) | Negativo |
| 94(3) | Negativo | 408(C-1) | Positivo |
| 95(1) | Negativo | 408(C-2) | Rugosa |
| 95(2) | Negativo | 409(C-1) | Rugosa |
| 95(3) | Negativo | 409(C-2) | Rugosa |
| 96(2) | Negativo | 411(C-1) | Negativo |
| 96(3) | Positivo | 411(C-2) | Negativo |
| 108(1) | Positivo | 412(C-1) | Negativo |
| 108(2) | Positivo | 412(C-2) | Negativo |
| 108(3) | Positivo | 412(C2-2) | Negativo |

Tabela 1 continuação

| | | | |
|--------------|----------|------------------------|----------|
| 413(C-1) | Negativo | E 57 (15) 10 | Positivo |
| 413(C-2-1) | Negativo | E 57 (17) 34 | Positivo |
| 413(C-2-2) | Negativo | E 57 (19) 13 | Positivo |
| 415(C-1) | Positivo | E 57 (25) 05 | Positivo |
| 416(C-1) | Positivo | E 57 (30) 17 | Negativo |
| 417(C1) | Negativo | E 57 (33) 02 | Negativo |
| 417(C2-1) | Positivo | E 57 (36) 12 | Negativo |
| 417(C2-2) | Positivo | E 57 (37) 07 | Rugosa |
| 417(C-3) | Negativo | E 57 (38) 08 | Negativo |
| 418(C-1) | Negativo | E 57 (40) 19 | Positivo |
| 418(C-2) | Negativo | E 57 (42) 01 | Rugosa |
| 419(C-2) | Negativo | E 57 (43) 22 | Positivo |
| 491(C-2) | Negativo | E 57 (44) 18 | Negativo |
| 492(C-1) | Rugosa | E 57 (48) 22 | Negativo |
| 495(C-2) | Negativo | E 57 (48) 29 | Positivo |
| 1162(D-1) | Positivo | E 57 (49) 09 | Positivo |
| 1162(D-5) | Positivo | E 57 (50) 21 | Positivo |
| 1162(D-6) | Negativo | E 57 (54) 06 | Negativo |
| 1162(D-7) | Positivo | E 57 (55) 33 | Positivo |
| 1162(D-8) | Negativo | EMBRAPA CNPEC 488(1) | Positivo |
| 1162(D-9) | Negativo | EMBRAPA CNPEC 488(2) | Negativo |
| 1162(D-10) | Positivo | EMBRAPA CNPEC 488(3) | Rugosa |
| 1803(2) | Negativo | EMBRAPA CNPEC 488(5) | Negativo |
| 1803(3-1) | Negativo | EMBRAPA CNPEC 577(1) | Positivo |
| 1803(4-1) | Positivo | EMBRAPA CNPEC 577(2) | Positivo |
| 1803(4-2) | Positivo | EMBRAPA CNPEC 577(3) | Positivo |
| 1803(5) | Negativo | EMBRAPA CNPEC 577(4) | Positivo |
| 1804(1-1) | Negativo | EMBRAPA CNPEC 1117(1) | Negativo |
| 1804(1-2) | Negativo | EMBRAPA CNPEC 1117(2) | Positivo |
| 1804(2-1) | Rugosa | EMBRAPA CNPEC 1117(4) | Negativo |
| 1804(2-2) | Rugosa | EMBRAPA CNPEC 1117(5) | Positivo |
| 1804(3-1) | Negativo | EMBRAPA CNPEC 1118(1) | Negativo |
| 1804(3-2) | Negativo | EMBRAPA CNPEC 1118(2) | Negativo |
| 1805(5-1) | Rugosa | EMBRAPA CNPEC 1118(3) | Negativo |
| 2147(4) | Positivo | EMBRAPA CNPEC 1162 (1) | Negativo |
| 2147(5-1) | Negativo | EMBRAPA CNPEC 1162(2) | Negativo |
| 2147(5-2) | Negativo | EMBRAPA CNPEC 1162(3) | Positivo |
| 3106(C-4) | Positivo | EMBRAPA CNPEC 1162(5) | Rugosa |
| 3987 (2) | Negativo | EMBRAPA CNPEC 1337(D2) | Negativo |
| E 57 (03) 16 | Negativo | EMBRAPA CNPEC 1337(D4) | Negativo |
| E 57 (04) 24 | Rugosa | EMBRAPA CNPEC 1393(2) | Positivo |
| E 57 (05) 31 | Negativo | EMBRAPA CNPEC 1393(3) | Positivo |
| E 57 (06) 15 | Rugosa | EMBRAPA CNPEC 1393(4) | Positivo |
| E 57 (06) 30 | Negativo | EMBRAPA CNPEC 1393(5) | Negativo |
| E 57 (07) 35 | Rugosa | EMBRAPA CNPEC 2147(1) | Negativo |
| E 57 (08) 01 | Positivo | EMBRAPA CNPEC 2147(2) | Positivo |
| E 57 (10) 11 | Negativo | EMBRAPA CNPEC 2147(3) | Negativo |
| E 57 (12) 14 | Positivo | EMBRAPA CNPEC 2147(4) | Positivo |
| E 57 (12) 32 | Negativo | EMBRAPA CNPEC 2277(2) | Negativo |
| E 57 (13) 23 | Negativo | EMBRAPA CNPEC 2277(5) | Negativo |
| E 57 (14) 26 | Positivo | EMBRAPA CNPEC 2279(1) | Positivo |

Tabela 1 continuação

| | | | |
|-----------------------|----------|-----------|----------|
| EMBRAPA CNPEC 2279(2) | Negativo | CG 1898-C | Negativo |
| EMBRAPA CNPEC 2279(3) | Positivo | CG 1898-D | Negativo |
| EMBRAPA CNPEC 2279(5) | Negativo | CG 1902-A | Negativo |
| EMBRAPA CNPEC 3009(2) | Negativo | CG 1902-B | Positivo |
| EMBRAPA CNPEC 3009(3) | Positivo | CG 1902-C | Positivo |
| EMBRAPA CNPEC 3009(4) | Negativo | CG 1902-D | Positivo |
| B 8233 | Negativo | CG 1905-A | Negativo |
| A 8236 | Positivo | CG 1905-B | Positivo |
| B 8236 | Positivo | CG 1905-C | Negativo |
| FRC A AMOSTRA 1 | Positivo | CG 1905-D | Negativo |
| FRC B AMOSTRA 1 | Positivo | 01 | Negativo |
| MANCHADO B-A | Negativo | 02 | Negativo |
| MANCHADO B-B | Negativo | 03 | Negativo |
| COXIM A AMOSTRA 4 | Negativo | 04 | Negativo |
| COXIM B AMOSTRA 4 | Positivo | 05 | Negativo |
| CNPEC A | Positivo | 06 | Negativo |
| CNPEC B | Positivo | 07 | Negativo |
| CNPEC 8190 | Negativo | 08 | Negativo |
| CÓLON B1-A | Negativo | 09 | Negativo |
| CÓLON B1-B | Negativo | 10 | Negativo |
| CECO B1-A | Negativo | 11 | Negativo |
| BRANCO V-A | Negativo | 12 | Positivo |
| BRANCO V-B | Negativo | 13 | Positivo |
| JN JNI Bezerro Branco | Negativo | 14 | Negativo |
| CG 1888-A | Positivo | 15 | Negativo |
| CG 1888-B | Negativo | 16 | Negativo |
| CG 1888-C | Negativo | 7230(1) | Negativo |
| CG-1888-D | Positivo | 7230(2) | Negativo |
| CG 1894-A | Negativo | 7230(3) | Negativo |
| CG 1894-B | Positivo | 7230(4) | Negativo |
| CG 1894-C | Positivo | 7230(5) | Negativo |
| CG 1894-D | Positivo | 6144(1) | Negativo |
| CG 1898-A | Positivo | 6144(2) | Negativo |
| CG 1898-B | Negativo | | |

Total de amostras (255): Positivas: 98, Negativas: 139, Rugosas: 18

A figura, a seguir, indica o resumo das porcentagens relativas de cada um dos fenótipos encontrados no ensaio de soroaglutinação:

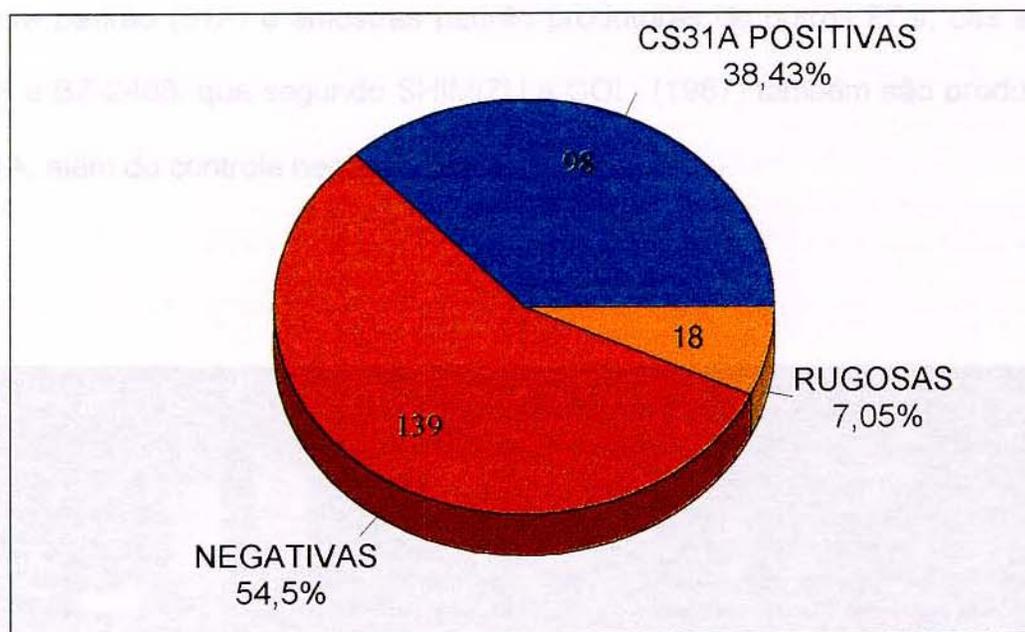


Figura 3: Distribuição das amostras testadas, de acordo com o fenótipo apresentado no teste de soroaglutinação. (N=255)

A co-expressão de outros fatores de virulência pelas amostras produtoras de CS31A foi avaliada. Os resultados são apresentados na Tabela 2, pág 55.

4.2 CONFIRMAÇÃO GENÉTICA DO CS31A:

4.2.1 - VERIFICAÇÃO DA FUNCIONALIDADE E ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES PARA O CS31A:

Na figura abaixo (FIGURA 4) encontram-se os resultados dos testes realizados com os iniciadores de nossa autoria FC CS31A-1 e FC CS31A-2, frente à amostra padrão (31A) e amostras padrão produtoras de outros FCs, das amostras BZ-43 e BZ-2468, que segundo SHIMIZU e COL. (1987) também são produtoras do CS31A, além do controle negativo DH5 α :

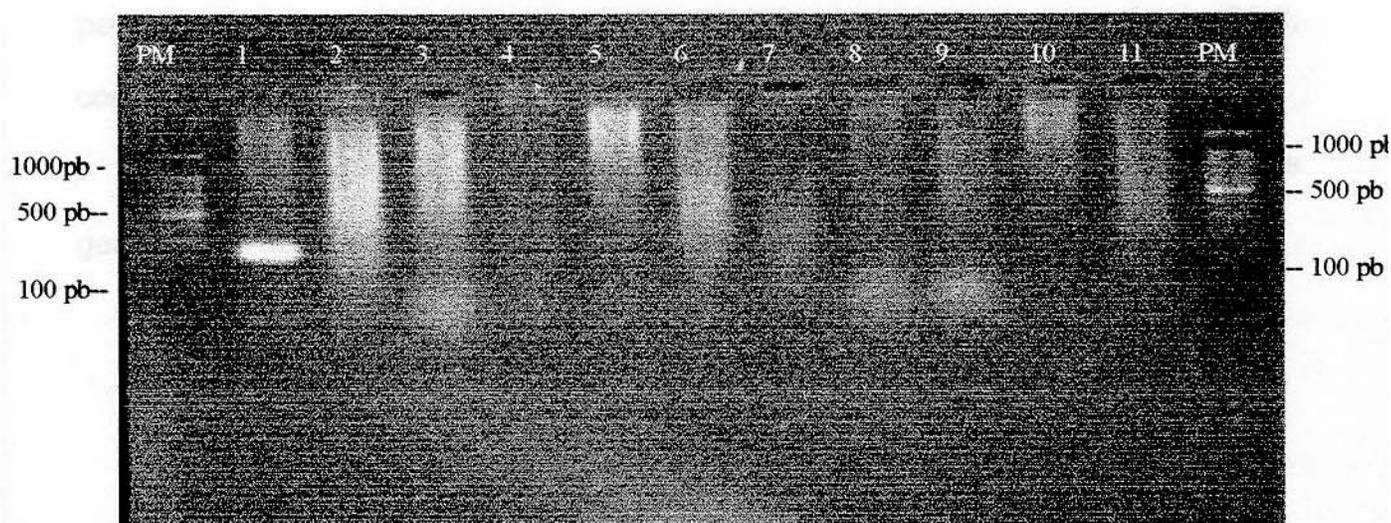


FIGURA 4: PCR das amostras padrão frente ao CS31A. Legenda: (1) – 31A (controle positivo); (2) - DH5 α (controle negativo); (3) - BZ-43; (4) - BZ 2468; (5) - K99; (6) - B41 (F41); (7) - K88 ab; (8) - K88 ac; (9) - K88 ad; (10) - F17 (ATT 25); (11) - 4787 (F165). Padrões de peso molecular foram inseridos nas extremidades, as bandas indicadas têm pesos de 100, 500 e 1000 pares de bases.

As seqüências escolhidas como iniciadores para a reação de PCR para o CS31A foram avaliadas quanto à especificidade. Assim todas as amostras padrão produtoras dos FCs envolvidos no ensaio. Os reagentes foram adicionados conforme descrito no Item 3.5.3, pág. 34, e os ciclos foram realizados nas temperaturas de 94°C, 56°C e 72°C.

Após a verificação da funcionalidade dos iniciadores, os mesmos foram utilizados na confirmação da presença do gene para o CS31A naquelas amostras que foram consideradas positivas para o CS31A nos testes de sorologiação. No total foram examinadas 88 amostras de campo, uma vez que 10 (10,20%) das amostras inicialmente positivas não puderam ser ensaiadas em virtude de terem sido perdidas. Das amostras ensaiadas, 47 (47,96%) amplificaram na reação de PCR, confirmando a presença do gene.

A Figura 5, apresenta o resumo dos resultados obtidos nos testes genotípicos, das amostras consideradas CS31A positivas em ensaios sorológicos:

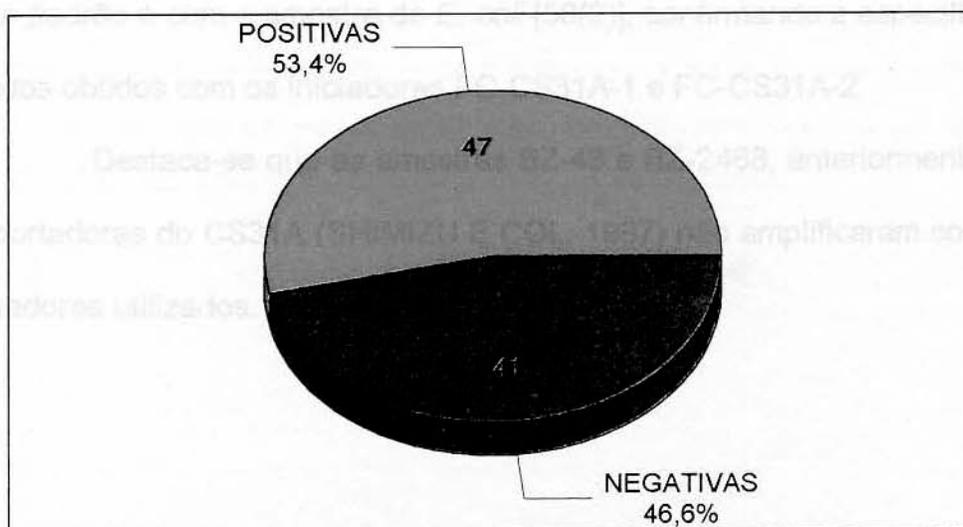


Figura 5: Perfil das amostras CS31A positivas fenotipicamente ao serem testadas em PCR (N=88).

4.2.2 – COMPROVAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DOS INICIADORES

PARA O CS31A:

Neste experimento, os iniciadores (clpG-1 e clpG-2) descritos por BERTIN e COL. (1998), também específicos para o CS31A, foram avaliados quanto à sua especificidade em comparação com os de nossa autoria (FC CS31A-1 e FC CS31A-2). Realizamos testes simultâneos com os dois pares dos iniciadores frente à amostra padrão (31A), uma amostra [50(2)], positiva para o CS31A em testes fenotípicos e genotípicos com os nossos iniciadores e uma amostra [88(6)], que foi inicialmente considerada positiva para o CS31A em ensaios sorológicos mas que não confirmou este resultado após os ensaios de PCR com os nossos iniciadores. Também foram incluídas neste experimento as amostras BZ-43 e BZ-2468, supostamente produtoras do CS31A segundo SHIMIZU e COL. (1987), Figura 6, pág 45.

Observou-se que ambos os pares de iniciadores amplificaram com a amostra padrão e com a amostra de *E. coli* [50(2)], confirmando a especificidade dos resultados obtidos com os iniciadores FC-CS31A-1 e FC-CS31A-2.

Destaca-se que as amostras BZ-43 e BZ-2468, anteriormente descritas como portadoras do CS31A (SHIMIZU E COL. 1987) não amplificaram com os pares de iniciadores utilizados.

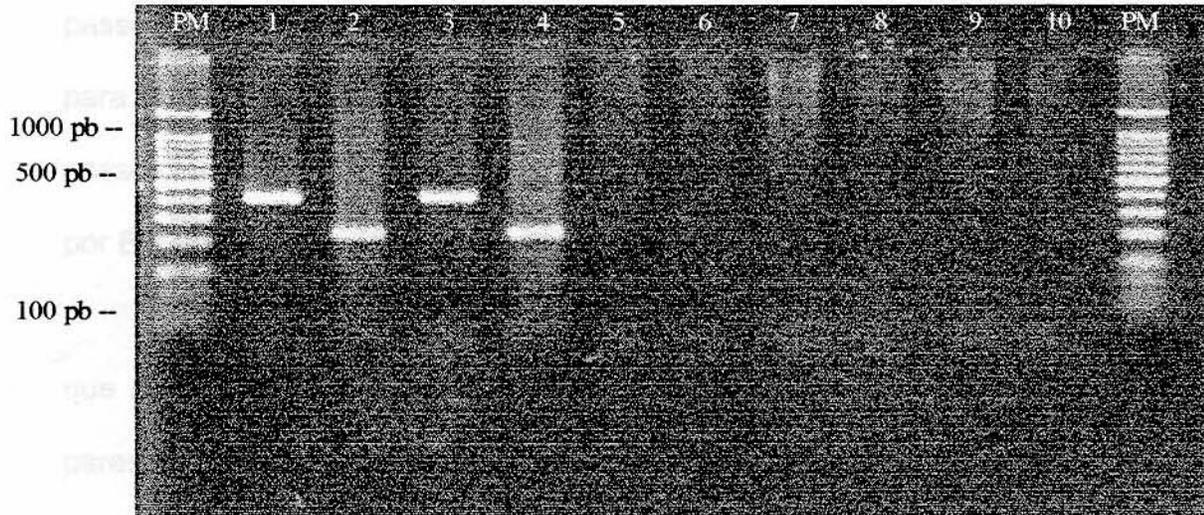


Figura 6: PCR para verificação da funcionalidade dos iniciadores para o CS31A. Legenda:(1 e 2) – 31A (c/ iniciadores clpG e c/ iniciadores CS31A, respectivamente); (3 e 4) amostra de campo 50(2) (c/ iniciadores clpG e c/ iniciadores CS31A, respectivamente); (5 e 6) amostra de campo 88(6) (c/ iniciadores clpG e c/ iniciadores CS31A, respectivamente); (7 e 8) BZ-43 (c/ iniciadores clpG e c/ iniciadores CS31A, respectivamente); (9 e 10) BZ-2468 (c/ iniciadores clpG e c/ iniciadores CS31A, respectivamente). Padrões de peso molecular foram inseridos nas extremidades, as bandas indicadas têm pesos de 100,500 e 1000 pares de bases.

4.2.3 - ESTUDO DAS AMOSTRAS DE CAMPO QUANTO À PRESENÇA DOS GENES PARA O CS31A:

Continuando a verificar a funcionalidade dos nossos iniciadores, passou-se a estudar as amostras que foram anteriormente consideradas positivas para o CS31A nos testes de soroaglutinação, a fim de verificar a especificidade dos nossos iniciadores, comparando com resultados obtidos com os iniciadores descritos por BERTIN e COL. (1998).

No total foram examinadas 88 amostras de campo, onde observou-se que somente 47 amostras produziram o produto da amplificação esperado com os pares de iniciadores citados.

4.3 - CO-EXPRESSÃO DE OUTROS FATORES DE VIRULÊNCIA:

A seguir, são apresentados os resultados obtidos nos testes genéticos e biológicos, sendo então divididos em tópicos conforme o fator estudado.

4.3.1 – FATORES DE COLONIZAÇÃO:

A) DETECÇÃO DO F5 (K99):

Para a detecção genotípica das amostras bacterianas positivas para o FC (F5) K99 estudaram-se todas as 47 amostras positivas para o CS31A determinadas geneticamente, empregando-se para isso os iniciadores descritos no item 3.5.3, pág 34 e foram encontradas 9 amostras positivas para este fator. Cabe ressaltar que a amostra 50(3) - canaleta 4 da figura 7 - e as amostras 306 (C2); E57(49)09; EMBRAPA 0577 B(4); EMBRAPA 1117(2) e EMBRAPA 2147(2) - canaletas 3, 5, 7, 8 e 9 da figura 8 - não se mostraram positivas para o CS31A nos ensaios de PCR, porém foram consideradas positivas nos ensaios sorológicos.

Nos ensaios fenotípicos, estas amostras também se revelaram positivas quando testadas frente ao antissoro monoespecífico para o F5 (K99).

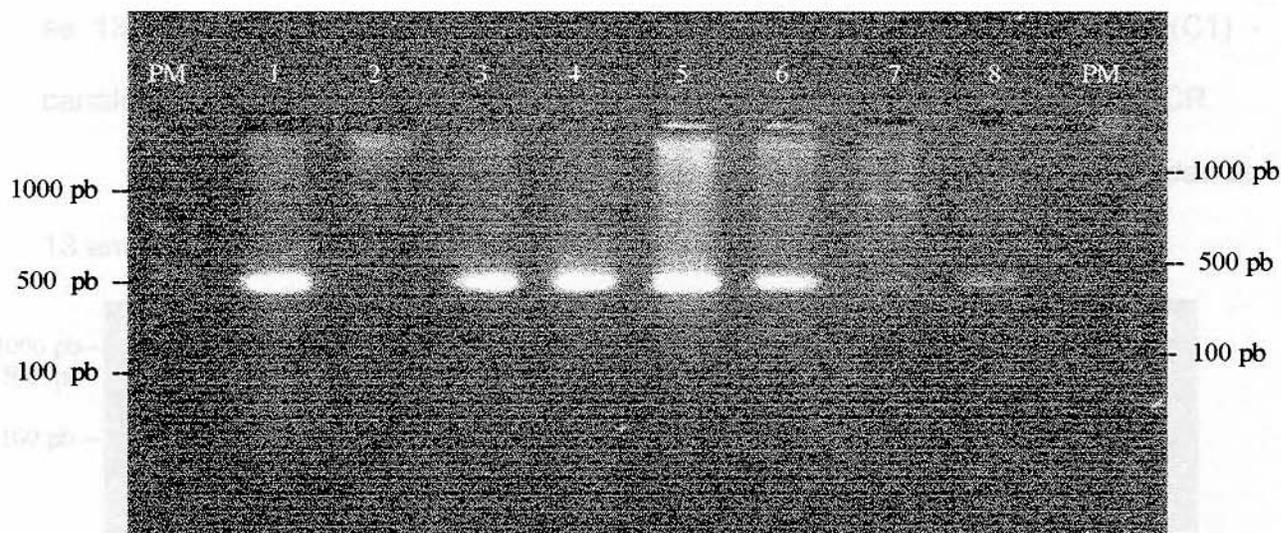


FIGURA 7: PCR das amostras de campo para o F5 (K99). Legenda: 1) – F82 (K99 (controle positivo); 2) – DH5 α (controle negativo); 3) – 50(2); 4) – 50(3); 5) – 90(2); 6) -108 (2); 7) – 304(C1); 8) – 306(C1).

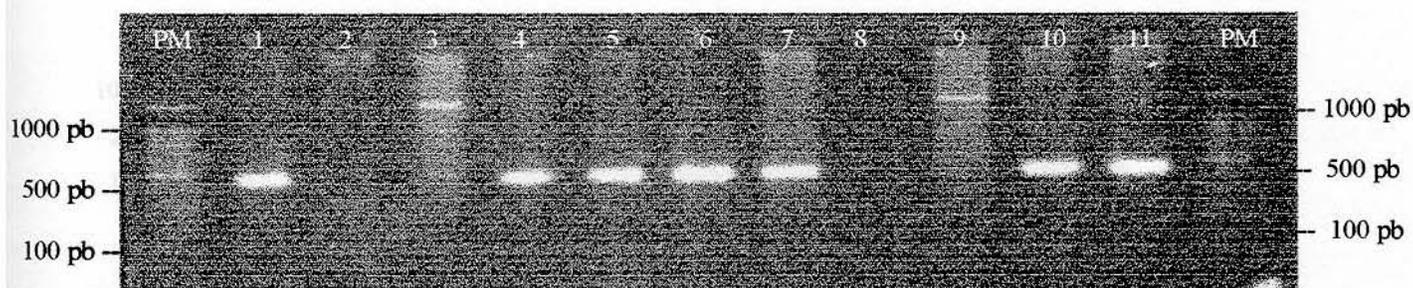


FIGURA 8: PCR das amostras de campo para o F5 (K99). Legenda: 1) – F82 (controle positivo); 2) – DH5 α (controle negativo); 3) – 306 (C2); 4) – 403 (C1); 5) – E 57 (49) 09; 6) – EMBRAPA 0577 B(3); 7) - EMBRAPA 0577 B(4); 8) – EMBRAPA 1117(2); 9) – EMBRAPA 2147(2); 10) – EMBRAPA 1162 D(3); 11- EMBRAPA 3009 (3).

B) DETECÇÃO DO F17:

Para a detecção genotípica das amostras bacterianas positivas para o FC F17, utilizaram-se todas as 47 amostras CS31A positivas e encontraram-se 13 amostras positivas para este fator. Ressaltando que a amostra 407(C1) - canaleta 10 da figura 9 - não é uma amostra CS31A positiva nos ensaios de PCR.

Este resultado também foi confirmado quando foram testadas as 13 amostras frente ao antissoro anti-F17.



FIGURA 9: PCR das amostras de campo para o F17. Legenda: 1) – ATT25 (controle positivo); 2) – DH5 α (controle negativo); 3) – 54(2); 4) – 86(4); 5) – 90(2); 6) – 90(5); 7) – 93(1); 8) – 93(4); 9) – 108(2); 10) – 407(C1); 11) – CG 1894-b; 12) – EMBRAPA CNPEC 0488(1).

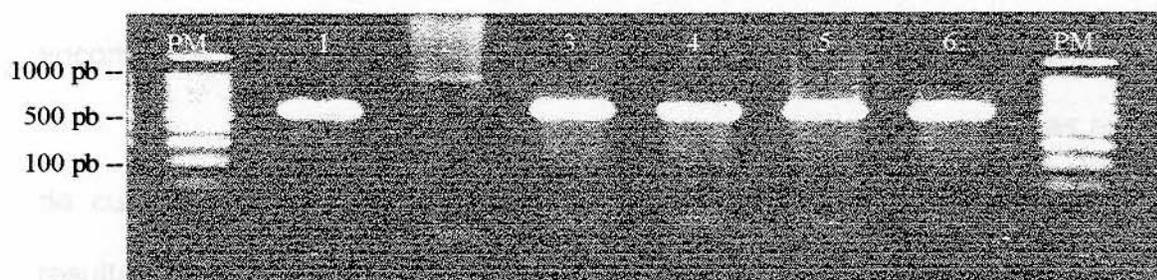


FIGURA 10: PCR das amostras de campo para o F17. Legenda: 1) – ATT25 (controle positivo); 2) – DH5 α (controle negativo); 3) – EMBRAPA CNPEC 0577 B(1); 4) – EMBRAPA CNPEC 0577 B(3); 5) – EMBRAPA CNPEC 1117(5); 6) – EMBRAPA CNPEC 3009 5(3).

C) DETECÇÃO DO F41:

Para este fator não foram encontradas amostras positivas nos ensaios fenotípicos e também não encontraram-se amostras positivas quando ensaiadas as 47 amostras CS31A positivas.

D) DETECÇÃO DO F165:

No caso do F165 encontraram-se apenas 2 amostras positivas nos ensaios fenotípicos, porém não foram realizados ensaios genotípicos para este fator.

4.3.2 – DETECÇÃO DE TOXINAS:

A) DETECÇÃO DE CNF:

Para o estudo da presença dos genes para a produção dos Fatores Necrosantes Citotóxicos do tipo I e II, utilizaram-se as 47 amostras CS31A positivas. Os iniciadores para CNF primeiramente utilizados são dirigidos para uma região homóloga para ambos os tipos (I e II), depois disso procurou-se utilizar iniciadores específicos para cada um dos fatores (CNF-I e CNF-II) mas só foram encontrados resultados positivos para CNF-I, em um total de 11 amostras.

Todas estas amostras foram consideradas positivas em ensaios de culturas de células realizado por SALVADORI e COL. 1997, confirmando o resultado genotípico obtido.

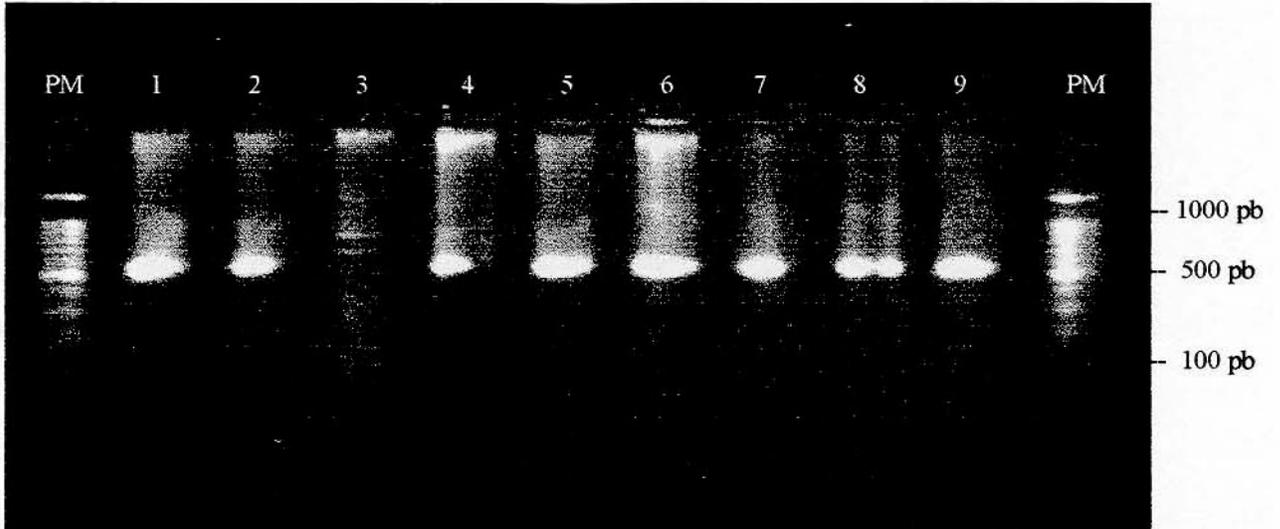


FIGURA 11: PCR das amostras de campo para o CNF. Legenda: 1) – MR48 (controle positivo – CNF-I+); 2) – B26a (controle positivo – CNF-II+); 3) – DH5 α (controle negativo); 4) – 54(5); 5) – 108(1); 6) – 108(2); 7) – 304(C1); 8) – 306(C2); 9) – 403(C1).

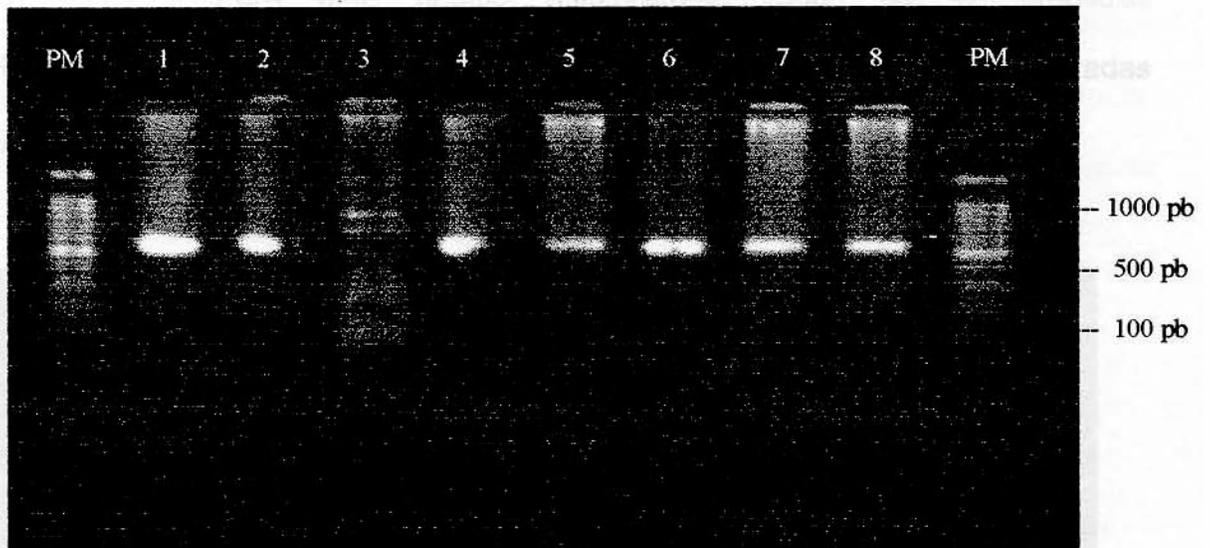


FIGURA 12: PCR das amostras de campo para o CNF. Legenda: 1) – MR48 (controle positivo – CNF-I+); 2) – B26a (controle positivo – CNF-II+); 3) – DH5 α (controle negativo); 4) – E 57 (12) 14; 5) – E 57 (14) 26; 6) – E 57 (15) 10; 7) – E 57 (17) 34; 8) – EMBRAPA CNPEC 2279 A(1).

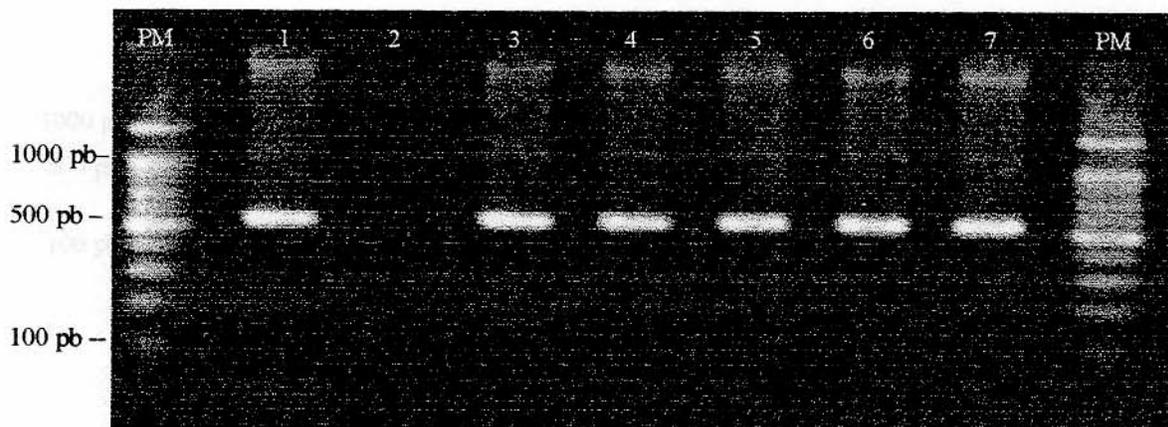


FIGURA 13: PCR das amostras de campo para o CNF-I. Legenda: 1) – MR48 (controle positivo – CNF-I+); 2) – DH5 α (controle negativo); 3) – B (CNPEC); 4) – CG 1888-a; 5) – CG 1888-d; 6) – CG1894-b; 7) – CG 1894-c.

C) DETECÇÃO DE ST-I:

Para o seguinte ensaio utilizaram-se as 47 amostras CS31A

B) DETECÇÃO DE EAST-I:

Para este ensaio utilizaram-se todas as 47 amostras consideradas positivas para o CS31A, porém só 14 amostras foram consideradas positivas, não foram realizados ensaios fenotípicos para este fator.

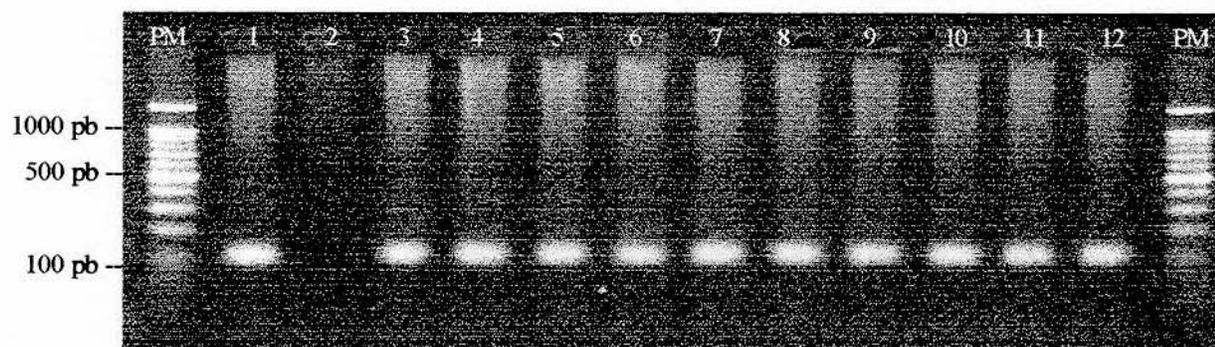


FIGURA 14: PCR das amostras de campo para EAST-I. Legenda: 1) – 042 (controle positivo); 2) – DH5 α (controle negativo); 3) – 50(2); 4) – 108(3); 5) – 108(4); 6) – 111(3); 7) – 301(C1); 8) – 304(C1); 9) – 304(C2); 10) – 306(C1); 11) – 403(C2); 12) – 404(C1).

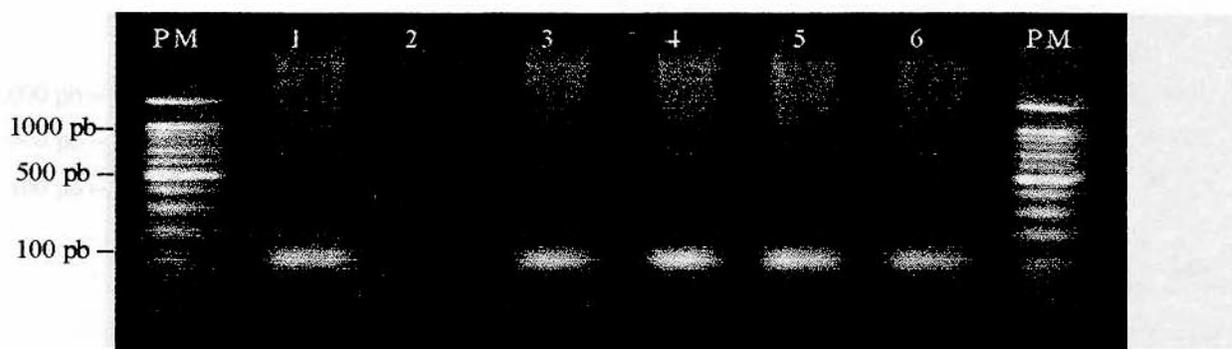


FIGURA 15: PCR das amostras de campo para EAST-I. Legenda: 1 – 042 (controle positivo); 2) – DH5 α (controle negativo); 3) – 404(C2); 4) – 407 (C1); 5) – 1803 4(2); 6) – B (CNPEC).

C) DETECÇÃO DE ST-I:

Para o seguinte ensaio utilizaram-se as 47 amostras CS31A positivas frente aos iniciadores para ST-I, as 7 amostras consideradas positivas foram submetidas ao teste do camundongo recém-nascido (teste de Dean) descrito no Item 3.5.B) para verificação de sua expressão e verificou-se ampla correlação entre os dois ensaios, sendo que a amostra EMBRAPA CNPEC 3009 5(3) - canaleta 6, figura 17 – não é uma amostra CS31A. positiva em ensaios de PCR.

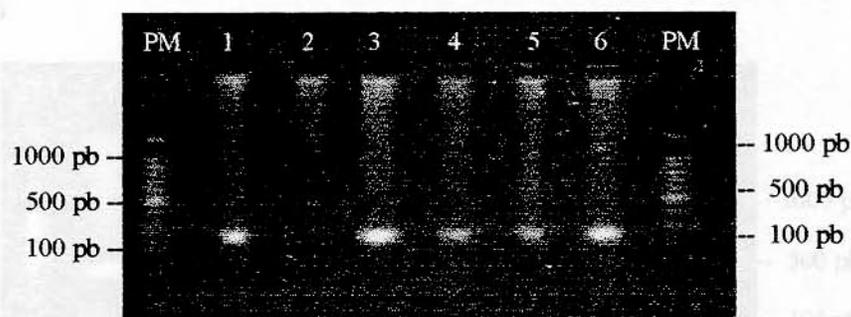


FIGURA 16: PCR das amostras de campo para ST-I. Legenda: 1) – F82 (controle positivo); 2) – DH5 α (controle negativo); 3) – CG 1888-a; 4) – CG 1888-d; 5) – CG 1894-b; 6) – CG1894-c.

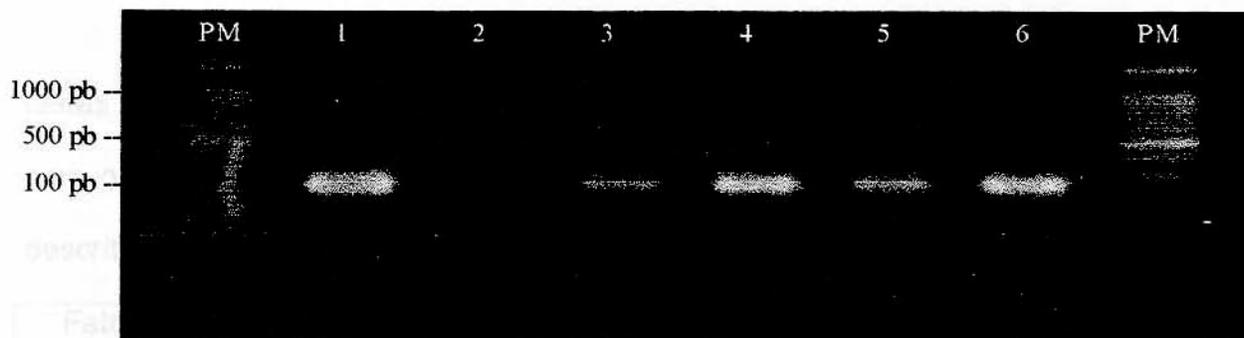


FIGURA 17: PCR das amostras de campo para ST-I. Legenda: 1) – B41 (controle positivo); 2) – DH5 α (controle negativo); 3) – E57 (08) 1; 4) – E57 (12) 14; 5) – E57 (17) 34; 6) EMBRAPA CNPEC 3009 5(3).

D) DETECÇÃO DE Stx-I e Stx-II:

Testaram-se as 47 amostras positivas para o CS31A para “Shiga-like Toxin”, (Stx-I e Stx-II) porém encontraram-se apenas amostras positivas para a Stx-I em um total de 4 amostras, sendo que a amostra 417 (C2-2) - canaleta 7, figura 18 - não é uma amostra CS31A. positiva em ensaios de PCR.

Estas amostras também foram testadas em ensaios de culturas de células (SALVADORI e COL. 1997) e mais uma vez encontramos total correlação entre os ensaios.

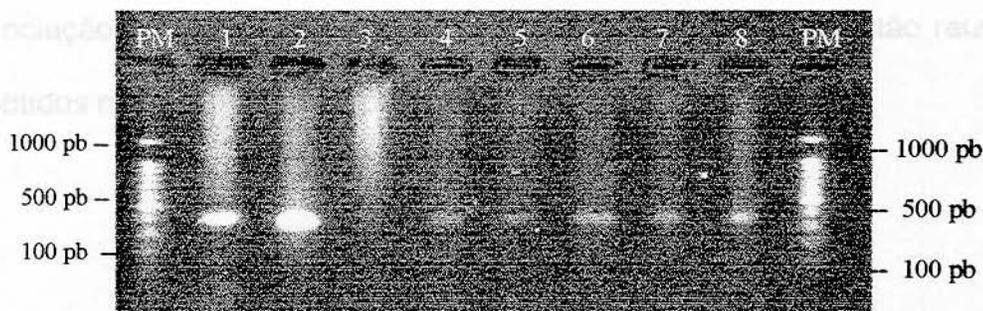


FIGURA 18: PCR das amostras de campo para Stx-I
Legenda: 1 e 2) – J2 (O157:H7) (controle positivo); 3) – DH5 α (controle negativo); 4) – 111(3); 5) – 304 (C2); 6) – 306 (C1); 7) - 417 (C2-2); 8) – 1162 (D1).

A seguir apresentamos um quadro com o sumário dos resultados obtidos nos testes genotípicos; estes referem-se apenas às amostras consideradas positivas para o CS31A em PCR avaliadas quanto à presença de outros fatores de virulência descritos.

| Fator de Virulência | Núm. de Amostras testadas | Núm. de Amostras Positivas |
|---------------------|---------------------------|----------------------------|
| CS31A | 88 | 47 |
| F5 (K99) | 47 | 9 |
| F17 | 47 | 13 |
| ST-I | 47 | 7 |
| EAST-I | 47 | 14 |
| Stx-I | 47 | 4 |
| CNF-I | 47 | 11 |

Na Tabela 2, a seguir, relacionamos apenas amostras CS31A positivas e a sua associação com os fatores de virulência aqui estudados, lá estão reunidos os dados obtidos nos ensaios fenotípicos e genotípicos.

TABELA 2: PRESENÇA DE OUTROS FATORES DE VIRULÊNCIAS NAS AMOSTRAS CS31A POSITIVAS EM ENSAIOS DE BIOLÓGICOS E MOLECULARES:

| AMOSTRA | SOROGRUPO | OUTROS FC(s) | | | | CITOTOXINAS | | | | | | |
|----------|-----------|--------------|-----|-----|------|-------------|------|-------|--------|-------|--------|---|
| | | F5(K99) | F17 | F41 | F165 | EAST-I | ST-I | CNF-I | CNF-II | Stx-I | Stx-II | |
| 50(2) | ND | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 54(2) | ND | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 54(5) | ND | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 86(4) | ND | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 90(2) | Rugosa | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 90(5) | Rugosa | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 93(1) | O25 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 93(4) | O25 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 108(1) | O153 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 108(2) | O153 | + | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 108(3) | O153 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 108(4) | O153 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 111(3) | ND | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + |
| 301(C-1) | ND | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 304(C-1) | O8 | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 304(C-2) | ND | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + |
| 306(C-1) | O8 | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + |
| 403(C-2) | O8 | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 404(C-1) | O2 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 404(C-2) | ND | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 407(C-1) | O8 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |

A associação do CS31A com outros FCs foi observada em 20 amostras (42,56%). Nestas, foi verificada a presença do F17 em 13 amostras, o que representa 27,66% do total de amostras positivas para o CS31A ou 65% do total portador de outros FCs. O F5 (K99) foi observado em 9 amostras, representando 19,15% do total e 45% do número de amostras positivas para outros FCs. Já o F165 foi encontrado em apenas 2 amostras, o que representa 4,25% do total absoluto e 10% do total de amostras portadoras de outros FCs. Não foram encontradas amostras positivas para o F41.

Assim, pode-se observar que das 47 amostras CS31A positivas em ensaios de PCR, 27 (57,44%) não apresentaram nenhuma associação com outro FC. Além disso, 27 amostras não apresentaram nenhum outro fator de colonização além do CS31A

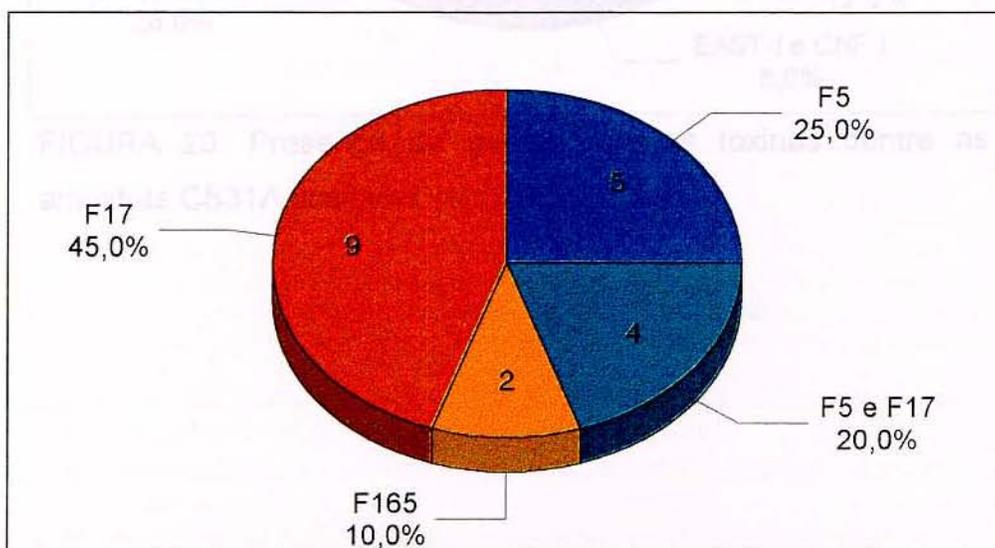


FIGURA 19: Presença de outros FCs dentre as amostras CS31a positivas. (N=20)

Dentre as amostras toxigênicas associadas ao CS31A, foi encontrada um total de 14 amostras portadoras de EAST-I, o que representa 29,78% do total de amostras portadoras do CS31A, para o CNF-I foram encontradas 11 amostras positivas, o que equivale a 23,40%, ST-I foi observado em 7 amostras (17,02%) e Stx-I foi encontrado em 4 (8,51%) das amostras. Os fatores CNF-II e Stx-II não foram encontrados em nenhuma das 47 amostras estudadas. Além disso, 22 amostras positivas para o CS31A não se mostraram positivas para nenhuma das citotoxinas estudadas:

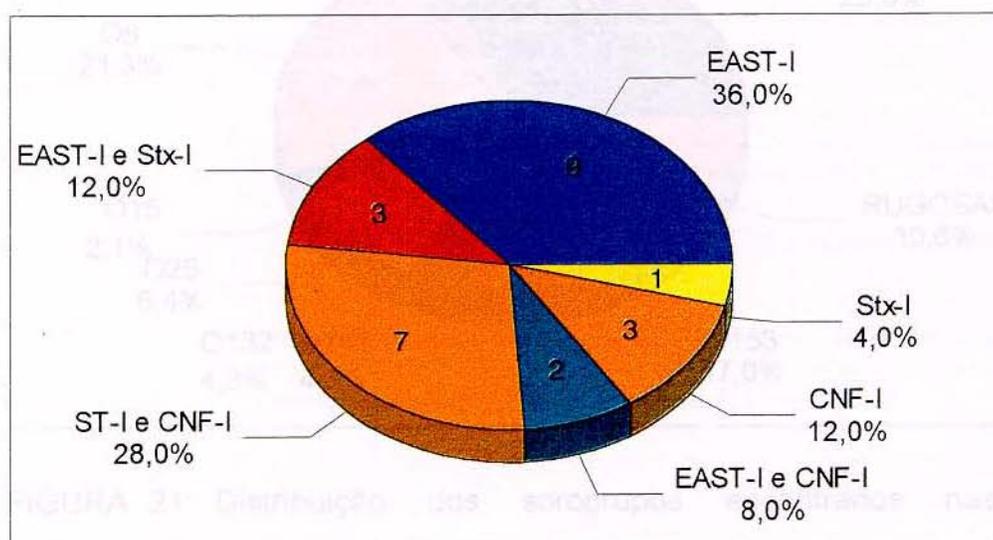


FIGURA 20: Presença de genes para as toxinas dentre as amostras CS31A positivas. (N=25)

A seguir, na Figura 21, pode-se observar a distribuição dos sorogrupos nas amostras CS31A positivas:

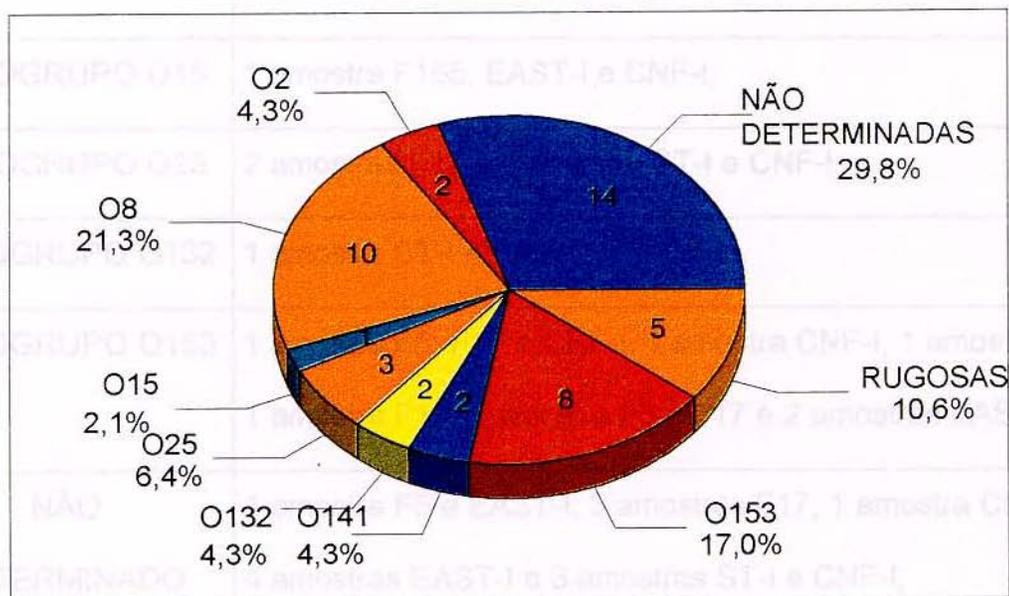


FIGURA 21: Distribuição dos sorogrupos encontrados nas amostras CS31A positivas. (N=47)

Quando se leva em conta a distribuição dos fatores de virulência associados ao CS31A, relacionando-os com os resultados obtidos na sorogrupagem, observamos as seguintes associações descritas no quadro a seguir:

| FENÓTIPO | AMOSTRAS |
|--------------------|---|
| SOROGRUPO O2 | 1 amostra EAST-I e 1 amostra ST-I ; |
| SOROGRUPO O8 | 1 amostra F5, EAST-I e CNF-I, 1 amostra F5, EAST-I e Stx-I, 1 amostra F5 e EAST-I, 1 amostra F165 e EAST-I, 1 amostra F5, 1 amostra F17 e 1 amostra EAST-I; |
| SOROGRUPO O15 | 1 amostra F165, EAST-I e CNF-I; |
| SOROGRUPO O25 | 2 amostras F17 e 1 amostra ST-I e CNF-I; |
| SOROGRUPO O132 | 1 amostra ST-I e CNF-I |
| SOROGRUPO O153 | 1 amostra F5, F17 e CNF-I, 1 amostra CNF-I, 1 amostra Stx-I, 1 amostra F17, 1 amostra F5 e F17 e 2 amostras EAST-I; |
| NÃO DETERMINADO | 1 amostra F5 e EAST-I, 3 amostras F17, 1 amostra CNF-I, 4 amostras EAST-I e 3 amostras ST-I e CNF-I; |
| RUGOSO | 1 amostra F5 e F17, 1 amostra F17, 1 amostra ST-I e CNF-I, 1 amostra F5, F17 e EAST-I. |

Quando comparadas frente ao número total de amostras CS31A positivas, verifica-se que 37 amostras foram positivas para pelo menos um outro fator de virulência equivalendo a 78,72% do total. Ao levar-se em conta o número total de amostras envolvidas no estudo (255 amostras), verifica-se que 10,19% das amostras

apresentam alguma toxina e que 20 amostras (7,84%) apresentam dois ou mais fatores de colonização (sendo que um deles obrigatoriamente é o CS31A).

Cabe ressaltar que as amostras denominadas como “108” (TABELA 1, pág. 37) apresentaram o mesmo sorogrupo, entretanto não foi detectado as mesmas características de virulência nestas, o que sugere que as amostras perderam genes durante o tempo de estocagem, uma vez que estas amostras foram isoladas por volta de 1988.

5 - DISCUSSÃO:

Neste trabalho buscou-se detectar o Fator de Colonização CS31A em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia no Brasil, bem como a sua associação com alguns outros fatores de virulência, descrição esta que ainda não consta da literatura.

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

No Brasil a referida doença é bastante comum e os poucos estudos realizados (YANO e COL. 1986, LEITE e COL. 1989, SARIDAKIS e COL. 1997) referem-se a um plantel restrito a localidades ou mesmo regiões de um estado, o que representa apenas uma pequena parcela do rebanho bovino nacional, estimado em 138.694.585 cabeças (IBGE 1999) .

Estudos mais abrangentes, envolvendo uma grande quantidade de animais e que representam adequadamente as diferenças de raça e finalidade de manejo são necessários para determinar a prevalência e sobretudo identificar os fatores de virulência associados à patogenia da doença no país. Estes estudos possibilitariam entender melhor a etiopatologia da colibacilose, e também forneceria o suporte científico necessário à produção de vacinas mais eficientes para atender às necessidades da pecuária de gado de leite e de corte.

No que tange à colibacilose bovina, a literatura especializada nacional ou internacional apresenta “lacunas” quanto à epidemiologia dos fatores de virulência que ocorrem no Brasil. Sabe-se que os fatores de colonização F5 (K99), F17 e F165 aparecem associados à diarreia, sem contudo se conhecer a sua real distribuição no país (CHARLES e FURLONG, 1992).

Para a realização deste trabalho, utilizamos ensaios fenotípicos e moleculares. Inicialmente procurou-se determinar a presença do fenótipo CS31A nas 255 amostras de *E. coli* envolvidas neste estudo. Para tanto, utilizamos ensaios de soroaglutinação em lâmina, nos quais encontramos 98 amostras positivas (38,43% do total).

Esta distribuição fenotípica, quando comparada em teste de χ^2 , está de acordo com os resultados de CONTREPOIS e COL. (1989) que, estudando 206 amostras bovinas isoladas na França, Canadá e Índia observaram que 86 (41,75%) delas expressavam o CS31A (teste χ^2 : 0,195; $\alpha=0,01\%$).

Para os testes moleculares foram desenhados iniciadores para o CS31A, pois quando do início dos trabalhos não havia disponível na literatura, tal descrição. Dessa forma, comparamos as seqüências dos genes que codificam para as subunidades dos fatores de colonização K88, F41 e CS31A e a partir de tal análise, foram escolhidos duas seqüências de oligonucleotídeos por nós denominados de FC-CS31A-1 e FC-CS31A-2 (pág. 33) para serem utilizadas como iniciadores na reação de PCR e que esperava-se serem específicos para a detecção genotípica do CS31A.

Quando da realização do ensaio de PCR, onde procurávamos confirmar a especificidade destes iniciadores, amostras padrão produtoras do CS31A descritas na literatura internacional e outras amostras padrão para outros fatores de colonização foram incluídas (FIGURA 4, pág 42). Neste experimento, não obtivemos o resultado esperado. As amostras BZ-43 e BZ-2468 (canaletas 3 e 4) da mesma figura, descritas por SHIMIZU e COL. (1987) como produtoras do CS31A, não apresentaram o produto de amplificação o produto esperado na reação.

SHIMIZU e COL. descreveram em 1987, o isolamento no Japão, de amostras de *E.coli* CS31A positivas isoladas de bezerros que, inicialmente, foram classificadas como produtoras de uma proteína de origem cromossômica. Essa proteína e que era composta por subunidades de peso molecular ao redor de 19 kDa e morfologicamente era semelhante a outras fímbrias, ou seja, filamentos longos e rígidos. Além disso, afirmam que o CS31A promove aglutinação em hemácias de bovinos. Para determinação do fenótipo da amostra BZ-43, supostamente produtora do CS31A, SHIMIZU e COL. (1987) descrevem a utilização de antissoro anti-F17 e anti-CS31A adquiridos do Laboratório IFFA, Rhône-Mérieux, Lyon – França.

Todavia, o CS31A descrito por CONTREPOIS e COL. (1986) e posteriormente por GIRARDEAU e COL. (1988) era de origem plasmidial, com peso molecular de 29 kDa e formado de “fibrilas” sobre a célula bacteriana, sendo assim classificado como antígeno “tipo-capsular” e afirmam que este não causa hemaglutinação.

As amostras BZ-43 e BZ-2468 gentilmente cedidas por M. Shimizu e a amostra 31A cedida por M. Contrepolis indicadas como CS31A positivas foram por nós utilizadas neste trabalho tanto para a obtenção de soro hiperimune, bem como nos ensaios de PCR.

A ausência de bandas no gel pode ser indicativo de que a proteína expressa pelas amostras BZ-43 e BZ-2468 pode ser apenas parcialmente semelhante ao CS31A e que os iniciadores por nós desenhados podem não estar encontrando homologia dentro da seqüência do gene responsável pela expressão do CS31A.

Após os ensaios genotípicos com os iniciadores FC CS31A-1 e 2, verificou-se que daquele número inicial de 98 amostras positivas no ensaio de aglutinação, apenas 47 (18,02% do total) se mostraram positivas para o CS31A no PCR (Figura 5, pág. 43).

Posteriormente, repetimos este experimento, utilizando-se desta vez os iniciadores clpG-1 e clpG-2 recentemente descritos por BERTIN e COL. (1998), e verificamos que ambos os pares de iniciadores amplificaram com as mesmas amostras, de modo que obteve-se 100% de correlação entre eles (figura 6, pág. 45). Concluimos, que ambos os pares de iniciadores são específicos para a identificação do CS31A nos ensaios moleculares e que as amostras BZ-43 e BZ-2468 possuem um FC relacionado sorologicamente ao CS31A mas diferente quanto à origem genética como exposto na figura 6 pág. 45.

Com isso, o número de amostras anteriormente identificadas como positivas para o CS31A passou de 98 para 47 (47,95%) quando da utilização do PCR na identificação desse FC, o que significa 18,43% do total de amostras inicialmente relacionadas neste estudo.

Por outro lado, observamos que 41 amostras (46,59%) que foram consideradas sorologicamente positivas para o CS31A não apresentaram o produto de amplificação esperado podem apresentar um antígeno sorologicamente relacionado ao CS31A como no caso das amostras BZ-43 e BZ-2468.

Procuramos verificar também se as amostras positivas para o CS31A apresentavam algum dos outros fatores de virulência selecionados para este estudo. Para tanto realizou-se “PCR” para determinação da presença dos outros fatores de virulência, e sua devida confirmação por ensaios fenotípicos (Tabela 2, pág. 54).

Quanto à detecção da fímbria F5 (K99), observamos que das 47 amostras estudadas, 9 (19,17%) foram consideradas positivas (Figuras 7 e 8, pág. 47) e este resultado foi confirmado fenotipicamente. CONTREPOIS e COL. (1989) relatam que, de 16 amostras F5 positivas, 7 (43,75%) foram positivas também para o CS31A, resultado este bastante diferente daquele por nós obtido. É evidente que a abordagem da pesquisa relatada por estes autores difere do nosso trabalho, invertendo-se o modo de relatar diríamos que dentre as 9 amostras F5 positivas, 100% delas apresentaram o CS31A.

No que se refere ao FC F41, não foram encontradas amostras positivas nos ensaios genéticos, e visto que o controle positivo para este ensaio amplificou adequadamente na reação de PCR, não houve necessidade de realizar estudos fenotípicos para este fator. Também não foram encontrados relatos na literatura citando a identificação de amostras portadoras destes dois fatores de colonização.

Quanto ao F165, temos a relatar que durante a execução deste trabalho, não encontramos na literatura descrição de iniciadores para este fator, tampouco encontramos referência quanto à similaridade da seqüência de nucleotídeos da subunidade deste fator com algum outro. Dessa forma, não julgamos conveniente desenhar iniciadores sem que se tivesse certeza de sua total especificidade. Portanto, os resultados aqui apresentados são referentes a ensaios sorológicos (fenotípicos).

Dentre as 47 amostras bacterianas CS31A positivas foram encontradas apenas duas amostras (4,3%) que foram aglutinadas pelo antissoro anti-F165. Resultado este bastante diferente do observado por CONTREPOIS e COL. (1989), que encontraram 17,3% de suas amostras apresentando esta associação.

Procuramos verificar a presença do FC F17 nas 47 amostras CS31A positivas, utilizando, para isso, os iniciadores para F-17 e antissoro específico. Encontramos a associação de 27,69% (13 amostras) para F17 em PCR (Figuras 9 e 10, pág. 48), resultados estes confirmados sorologicamente. BERTIN e COL. (1998) relatam que cerca de 50% das amostras CS31A apresentam associação com F17. Entretanto nos nossos resultados esta proporção não foi observada.

Quanto à presença da toxina EAST-I nas 47 amostras CS31A positivas, utilizamos os iniciadores descritos por YAMAMOTO e COL. (1996), observamos que 14 amostras (29,78%) amplificaram o produto esperado (Figuras 14 e 15, págs. 51 e 52), o que diferencia-se do trabalho de BERTIN e COL. (1998) onde, analisando 56 amostras de *E.coli* isoladas de bezerros com diarreia ou septicemia observaram uma forte associação da presença de genes para CS31A e EAST-I onde 87% das amostras CS31A positivas apresentaram o gene para EAST-I. Dada a tamanha associação por eles observada, especula-se sobre uma possível ligação genética entre o CS31A e a EAST-I.

Já no estudo das citotoxinas obtivemos 100% de correlação entre os estudos genotípicos e fenotípicos. Todas as amostras anteriormente identificadas através de ensaios em cultura de células como CNF positivas (SALVADORI e COL., 1997) foram utilizadas em testes de PCR para a determinação do tipo (1 ou 2). Nos nossos experimentos verificamos que se tratava de CNF-I em todas as amostras ensaiadas.

BERTIN e COL. (1998) encontraram também alta associação do CS31A com o CNF-I (71% de CS31A em 56 amostras CNF-I+), partindo do caminho inverso, foram encontradas 11 amostras CNF-I+ (23,1%) nas 47 amostras CS31A positivas (Figuras 11, 12 e 13, págs 50 e 51).

Ao analisarmos associações ainda não descritas na literatura encontramos a presença da enterotoxina ST-I (Figuras 16 e 17, págs 52 e 53) e da “Shiga-Like Toxin” do Tipo-I – Figura 18 pág. 53 - (14,91% e 10,65%, respectivamente). Estas associações podem significar novos exemplos de associação entre toxinas e um fator de adesão, fornecendo mais evidências da importância do CS31A como fator de virulência em *E. coli*.

Para os estudos de sorogrupagem das amostras CS31A positivas, foi empregado um “kit” que contém 167 antissoros monoespecíficos disponíveis para diagnóstico, e ainda assim 12 (25,53%) das 47 amostras não apresentaram reação positiva para nenhum deles, sendo classificadas como não determinadas (Tabela 2, pág. 54). Foram encontradas amostras pertencentes aos grupos ditos prevalentes para o CS31A segundo CONTREPOIS e COL. (1989): O2, O8, O15 e O25 e O141 além de amostras pertencentes aos sorogrupos O132 (4,3%) e O153 (17%), sendo que quando comparadas apenas estas últimas frente ao número total de amostras tipadas, chega-se a um número ainda mais expressivo (15,15% para o O132 e 24,24% para o O153), dado este ainda inédito na literatura.

Em um experimento posterior, utilizou-se soro anti-BZ-43 frente às 47 amostras produtoras do CS31A confirmadas geneticamente e frente às 41 amostras que não confirmaram este genótipo. Em todas foi observada aglutinação (dados não apresentados). Quando utilizou-se este mesmo antissoro absorvido com a amostra

31A frente às 88 amostras consideradas positivas fenotipicamente, as 47 amostras identificadas geneticamente como CS31A+ deixaram de apresentar resultado positivo, enquanto as outras 41 CS31A - mantiveram o resultado positivo.

Como a amostra 31A, aqui utilizada, também é amostra padrão para um dos subtipos do F17 [o F17-c] (BERTIN e COL. (1998), procurou-se testar a amostra BZ-43 frente aos iniciadores para o F17 e o resultado foi positivo. Assim esperava-se que todas aquelas amostras que não confirmaram o resultado genético fossem também positivas para o F17, contudo essas amostras já não tinham sido positivas quando testadas com o antissoro anti-F17 (Tabela 2 pág. 54). Ao testarmos estas amostras frente aos iniciadores para F17, obteve-se uma freqüência bastante similar àquela encontrada nas amostras CS31A positivas geneticamente (em 42 amostras apenas 13 positivas – 30,95%, enquanto nas 47 amostras CS31A positivas geneticamente encontrou-se 13 amostras positivas – 27,69%) além do que, ao testar-se o antissoro anti-BZ-43 absorvido com a amostra 31A frente à amostra padrão para o F17 (ATT 25) não observou-se a aglutinação que era encontrada nas amostras de campo.

Verificamos, ainda, que o CS31A pode ser encontrado isolado ou pode também ser encontrado associado com outros fatores de virulência diversos, inclusive com a ocorrência do CS31A associado com a enterotoxina ST-I e com a citotoxina Stx-I. Estas associações ainda não haviam sido descritas na literatura, o que vem a acrescentar a importância do CS31A nas amostras de campo no Brasil.

Atualmente existem vários tipos de vacinas contra a colibacilose em bezerros, com a finalidade de estimular a imunidade contra os principais fatores de virulência de *E. coli* nos animais recém-nascidos. As vacinas mais usadas comercialmente são

administradas por via subcutânea ou intramuscular nas vacas prenhas para estimular a formação de anticorpos, que são transferidos passivamente por meio do colostro aos bezerros recém nascidos. Estes anticorpos agem localmente no intestino delgado e podem prevenir infecções posteriores durante o período sensível, uma vez que os animais jovens são sensíveis à colonização apenas no período de 2 a 10 dias após o nascimento, podendo também ocorrer de 12 a 18 horas após o nascimento e, ocasionalmente em animais com 3 semanas de idade (RHÓDIA-MERIEUX, 1996).

As *E. coli* intestinais, que antes eram relegadas a ser apenas um inofensivo habitante do trato intestinal, são vistas como uma espécie patogênica com incrível versatilidade e na sua habilidade de causar doenças no homem e em animais. Surto de doenças causadas por *E. coli* podem afetar milhares de indivíduos e mobilizar consideráveis esforços tanto nacional quanto internacionalmente. Novos fatores de virulência têm sido descobertos e estes afetam um largo espectro de processos em células eucarióticas, tais como a síntese de proteínas, divisão celular, secreção de íons e transcrição. Estes fatores são codificados por uma variedade de elementos genéticos tais como ilhas de patogenicidade e elementos móveis tais como plasmídios, bacteriófagos e transposons. Esta plasticidade genômica implica em rearranjo dos fatores de virulência, complicando os esforços para categorizar os vários subgrupos que poderiam delinear os patotipos. Este dinamismo representa novos desafios no diagnóstico, no tratamento e na prevenção das infecções por *E. coli*.

Pretendemos seguir investigando a identidade do antígeno expresso pela amostra BZ-43 e pelas amostras de campo que também apresentam reação sorológica positiva mas não se mostraram positivas para o F17 e para o CS31A nos

ensaios de PCR. Temos fortes indícios para acreditar que se trata de um fator ainda não caracterizado que, em se confirmando nossas suspeitas, apareceu nas amostras estudadas numa proporção tão grande quanto a do CS31A., visto que 41 (41,83%) das 98 amostras inicialmente consideradas CS31A positivas não confirmaram o genótipo, em termos percentuais esse número representa 16,07% de todas as 255 amostras envolvidas inicialmente no estudo, lembrando que o total de amostras confirmadas como CS31A foi de 47 amostras ou 18,43% do total inicial.

Soma-se, a isso, o fato de que em 1996 a empresa multinacional Rhodia-Mérieux passou a importar e a comercializar uma vacina (TRIVACTON 6) que contém, entre outros imunógenos o FC CS31A, essa vacina está disponível no mercado desde o segundo semestre daquele ano (RHODIA-MÉRIEUX, 1996). Conforme a utilização deste produto pelos pecuaristas, poderemos eventualmente observar uma alteração na frequência de isolamento desse fator nas amostras de campo, visto a pressão que será estabelecida com o uso no campo da vacina citada.

Novos fatores de colonização ainda não descritos e, portanto, não incluídos nas vacinas comerciais poderão ser responsáveis por surtos num futuro não muito distante, para os quais os técnicos ainda não estão preparados.

6 - CONCLUSÕES:

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, concluímos:

1) O CS31A encontra-se presente em amostras de *E. coli* no Brasil e, conforme sua frequência detectada nos isolados estudados (18,43%), pode ser um fator de grande importância na patogenia da *E. coli* no rebanho bovino brasileiro.

2) A associação do CS31A com as toxinas Stx-I e ST-I aqui detectada, confere mais importância a estas amostras, evidenciando também uma nova interação entre este fator de colonização e citotoxinas.

3) A metodologia desenvolvida para o diagnóstico molecular do CS31A trouxe mais segurança, mais especificidade e maior rapidez para a realização dos ensaios.

4) A detecção da presença do CS31A em amostras dos sorogrupos O132 (4,3%) e O153 (17%), sobretudo em alta porcentagem, é um dado novo para a literatura.

5) Os resultados sorológicos e genéticos obtidos sugerem a possível existência de um fator de colonização ainda não caracterizado, que apresenta semelhanças antigênicas com o CS31A.

6) Este novo possível fator de colonização, presente em 41' das 255 amostras estudadas (16,07% do total), evidencia nova relação com possíveis mecanismos de virulência que merecem investigação.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ADAMS, L.M.; SIMMONS, C.P.; REZMAN, L.; STRUGNELL, R.A. e ROBINS-BROWNE, R.M. 1997. Identification and characterization of a K88- and CS31A like operon of a rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* strain which encodes fimbriae involved in the colonization of rabbit intestine. *Infect. Immun.* **65**: 5222-5230.
- ÁVILA, F.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; LALLIER, R.; JACQUES, M. e FAIRBROTHER, J.M. 1988. A new fimbrial antigen on *Escherichia coli* strain isolated from diarrheic zebu (*Bos indicus*) calves with diarrhea in Brazil. *Vet Record.*, **123**: 80-81.
- BERTIN, Y.; MARTIN, C.; GIRARDEAU, J.P.; POHL, P. e CONTREPOIS, M. 1998. Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF-1 producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS Microbiology Letters.* **162**: 235-239.
- BERTIN, Y.; MARTIN, C.; OSWALD, E. e GIRARDEAU, J.P. 1996. Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2921-2928.
- BLANCO, J. e BLANCO, M. 1993. *Escherichia coli* enterotoxigenicos, necrotoxigenicos y verotoxigenicos, de origen humano y bovino; patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. In: Servicio publicaciones diputacion provincial Lugo, Espanha.

- BLANCO, J.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; BLANCO, J.E.; GARABAL, J.I. e GONZÁLEZ, E.A. 1992. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing necrotizing factors CNF1 and CNF2. FEMS Microbiol. Lett. **96**: 155-160.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; ALONSO, M.P.; BALSANOBRE, C.; MOURIÑO, M.; MADRID, C. e JÚÁREZ, A. 1996(b). Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotoxic factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). J. Microb. Meth. **26**: 95-101
- BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; MORA, A.; BALAGUER, L.; MOURIÑO, M., JÚÁREZ, A. e JANSEN, W.H. 1996(a). O serogroups, biotypes and *eae* genes in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy rabbits. J. Clin. Microbiol. **34**: 3101-3107.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; RODRÍGUEZ, E.; ABALIA, I.; ALONSO, M.P. e BLANCO, J. 1997. Detection of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction (PCR); comparison with results obtained using phenotypic methods. J. Microb. Meth. **31**: 37-43.
- CENSO AGROPECUÁRIO 1995 1996. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1999. <http://www.sidra.ibge.gov.br/sidra/agro/agro.htm>.
- CHANTER, N.; HALL, G.A.; BLAND, A.P. 1986. Dysentery in calves caused by an atypical strain of *Escherichia coli* (S102-9). Vet. Microbiol. **12**: 241-253.
- CHINA B; JACQUEMIN E; DEVRIN AC; PIRSON V. e MAINIL J. 1999. Heterogeneity of the *eae* genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with human strains. Res Microbiol, **150**: 323-332

- CONTREPOIS, M.; DUBOURGUIER, H.C.; PARODI, A.L.; GIRARDEAU, J.P. e OLLIER, J.L. 1986. Septicemic *Escherichia coli* and experimental infection of calves. *Vet Microbiol.* **12**: 109-118.
- CONTREPOIS, M.; FAIRBROTHER, J.M.; KAURA, Y.K. e GIRARDEAU, J.P. 1989. Prevalence of CS31A and F165 surface antigens in *Escherichia coli* isolates from animals in France, Canada and India. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**: 319-324.
- De RICKE, J.; MILON, A. e OSWALD, E. 1999. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC); two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet. Res.* **30**: 221-233.
- DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIAMS, R.G. e HARDEN, L.B. 1972. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* **125**:407-411.
- DI MARTINO, P.; BERTIN, Y.; GIRARDEAU, J.P.; LIVRELLI, V.; JOLY, B. e DARFEUILLE-MICHAUD, A. 1995. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect. Immun.* **63**: 4336-4344.
- DONNENBERG, M.S. e KAPER, J. B. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**: 3953-3961.
- DUBREIL, J.D. 1997. *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology* **143**: 1783-1795.
- DUNCAN, S.E. e HACKNEY, C.R. 1994. Relevance of *Escherichia coli* O157:H7 to the dairy industry. *Dairy Food and Environmental.* **14**: 656-660.
- EVANS, D.G.; EVANS, D.G. Jr & GORBACH. S.L. 1973. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.* **8**: 725-730.

- ESPINASSE, J.; NAVETAT, H.; CONTREPOIS, M.; BAROUX, D. e SCHELCHER.
1991, A new diarrhoeic syndrome with ataxia in young Charolais calves: clinical and microbiological studies. *Vet. Rec.* **128**: 422-425.
- FAIRBROTHER, J.M.; LARIVIÈRE, S. e LALLIER, R. 1986. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. *Infect. Immun.* **51**: 10-15.
- FASANO, A.; KAY, B.A.; RUSSEL, R.G.; MANEVAL, D.R. e LEVINE, M.M. 1990. Enterotoxin and cytotoxin production by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **58**: 3717-3723.
- FIDOCK, D.A.; McNICHOLAS, P.A. e LEHRBACH, P.R. 1989. Nucleotide sequence of the F41 fimbriae subunit gene in *Escherichia coli* B41. *Nucleic Acids Res.* **17**: 2849-2849.
- GANNON, V.P.J. e GYLES, C.L. 1990. Characteristics of the Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease. *Vet. Microbiol.* **24**: 89-100.
- GIRARDEAU, J.P.; BERTIN, Y.; MARTIN, C.; DER VARTANIAN, M. e BOEUF, C. 1991. Sequence analysis of the *clpG* gene, which codes for surface antigen CS31A subunit: Evidence of an evolutionary relationship between CS31A, K88 and F41 subunit genes. *J. Bacteriol.* **173**: 7673-7683.
- GIRARDEAU, J.P.; Der VARTANIAN, M.; OLLIER, J.L. e CONTREPOIS, M. 1988. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* **56**: 2180-2188.

- GUINÉE P.A.M.; AGTERBERG, C.M. e JANSEN, W.H. 1972. *Escherichia coli* O antigen typing by means of a mechanized microtechnique. *Appl. Microbiol.* **24**: 127-131.
- GUINÉE, P.A.M.; VELTKAMP, J. e JANSEN, W.H. 1977. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **15**: 676-678.
- GYLES, C.L. 1986. *Escherichia coli*. In: C.L. GYLES and C.O. THOEN (eds.) Pathogenesis of bacterial infections in animals. p.114-131. The Iowa State University Press, Ames, E.U.A.
- GYLES. C.L. 1992. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can J. Microbiol.* **38**: 734-746.
- HOLLAND, R. E. (1990). Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 345-375.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. e WILLIAMS, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams e Wilkins.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. e WHITE, T.J. 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press.
- ISAACSON, R.E.; NAGY, B. e MOON, H.W. 1977. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: colonization and adhesion factors of pig enteropathogenic that lack K88. *J. Infect. Dis.* **135**: 531-539.
- JACKSON, M.P.; NEWLAND, J.W.; HOLMES, R.K. e O'BRIEN, A.D. 1988. Nucleotide sequence analysis of the structural genes for shiag. *Microbiol. Pathogen.* **2**: 147-153.

- JACKSON, M.P.; NEILL, R.J.; O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K. e NEWLAND, J.W. 1987. Nucleotide sequence analysis and comparisson of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **44**: 109-114.
- JALLAT, C.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; GIRARDEAU, J.P.; RICH, C. e JOLY, B. 1994. Self-transmissible R plasmids encoding CS31A among human *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal stools. Infect. Immun. **62**: 2865-2873.
- KAPER, J.B.; McDANIEL, T.K. e JARVIS, K.G. 1996. Molecular Genetics of enteropathogenic *Escherichia coli*. Rev Microbiol. **27**: 82-88.
- KORTH, M.J.; APOSTOL JR, J. M. e MOSELEY, S.L. 1991. Functional expression of heterologous fimbrial subunits mediated by the F41, K88, and CS31A determinants of *Escherichia coli*. Infect. Immun. **60**: 2500-2505.
- KORTH, M.J.; LARA, J.C. e MOSELEY, S.L. 1994. Epithelial cell invasion by bovine septicemic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **62**: 41-47.
- KRESS, A.U.; ROHDE, M. e ; GUZMÁN,C.A. 1999. 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.
- LEITE, D.S.; GARCIA, M.; YANO, T. e CASTRO, A. F. P. 1989. Detecção da adesina FY em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarréia no Brasil. Rev. Microbiol. **20**: 292-295.

- LINTERMANS, P.F.; POHL, P.; BERTELS, A.; CHARLIER, G.; Van DEKERCKHOVE, J.; Van DAMME, J.; SCHOUPE, J.; SCHLICKER, C.; KORHONEN, T.; De GREVE, H. e Van MONTAGU, M. 1988. Characterization and purification of F17 adhesin on the surface of bovine enteropathogenic and septicemic *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.* **49**: 1794-1799.
- MOLENDIA, J.R. 1994. *Escherichia coli* (Including O157:H7): An environmental Health perspective. *Dairy, Food Environ. Sanit.* **14**: 742-747.
- MORRIS, J.A.; STEVENS, A.E. e SOJKA, W.J. 1978. Anionic and cationic components of the K99 surface antigen from *Escherichia coli* B41. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 173-175.
- NATARO, J.P. e KAPER, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 142-201
- PENNSYLVANIA STATE UNIVERSITY, *Escherichia coli* Reference Center.
<http://www.ecoli.cas.psu.edu/home.htm>
- OJENIYI, B.; AHRENS, P. e MEYLING, A. 1994. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. *J. Vet. Med.* **B 41**: 49-59.
- ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I.; SMITH, H.W. e SOJKA, W.J. 1975. The establishment of K99, a thermolabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* **83**: 31-36.

- ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; SOJKA, W.J. e LEACH, J.M. 1961. Simultaneous occurrence of *Escherichia coli* B and antigens in strains from diseased swine. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **53**: 404-422.
- REED, G.H., 1994. Foodborne illness (part 8) *Escherichia coli*. *Dairy Food Environ. Sanit.* **14**: 329-330.
- RHODIA-MÉRIEUX. 1996 Boletim técnico informativo.
- ROOSSEDAAL, B.; GAASTRA, W. e De GRAAF, F.K. 1984. The nucleotide sequence of the gene encoding the K99 subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **22**: 253-258.
- SALVADORI, M.R.; DELLA COLLETA, H.H.M. e YANO, T. 1997. Produção de citotoxinas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia. *Anais do XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia.* p 128.
- SALYERS, A.A. e WHITT, D.D. 1994. Bacterial pathogenesis, a molecular approach. ASB Press.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. e MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cap. 6. Cold Spring Harbor Lab Press.
- SARIDAKIS, H.O.; ELGAREL, S.A.; VIDOTTO, M.C.; GUTH, B.E.C. 1997. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups from calves with diarrhea. *Vet. Microbiol.* **54**:145-153.
- SEARS, C.L. e KAPER, J.B. 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microb. Rev.* **60**: 167-215.
- SHIMIZU, M.; SAKANO, T.; YAMAMOTO, J. e KITAJIMA, K. 1987. Incidence and some characteristics of fimbriae FY and 31A of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Japan. *Microbiol. Immunol.* **31**: 417-426.

- SO, M. e McCARTHY, B.J. 1980. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **77**: 4011-4015
- Van SOOLINGEN, D. *et al.* Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strains differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. **33**: 1987-1995.
- VIEIRA, SONIA. Introdução à Bioestatística. 1981, Editora Campus.
- YAMAMOTO, T. e ECHEVERRIA, P. 1996. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. Infect. Immun. **64**: 1441-1445.
- YANO, T.; LEITE, D.S.; CAMARGO, I.J.B. e PESTANA DE CASTRO, A.F. 1986. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. Microbiol. Immunol. **30**: 1495-508.
- YANO, T.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; GARCIA, M.; CASTRO, A.F.P. 1986. Produção de verocitotoxina (VT) em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarréia. Rev. Microbiol., **17**: 339-341.