

ANDRESA ZAMBONI

**ESTUDOS GENÉTICOS SOBRE A VIRULÊNCIA DE
Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA ATÍPICA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

São Paulo
2006

ANDRESA ZAMBONI

**ESTUDOS GENÉTICOS SOBRE A VIRULÊNCIA DE
Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA ATÍPICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia.

Orientadora:
Prof^a Dra. Isabel Cristina Affonso Scaletsky

São Paulo
2006

Zamboni, Andresa

Estudos genéticos sobre a virulência de *Escherichia coli* enteroagregativa atípica. / Andresa Zamboni. -- São Paulo, 2006.

22, 118f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia.

Título em Inglês: Genetic studies on the virulence of atypical enteroaggregative *Escherichia coli*.

1. *Escherichia coli* enteroagregativa. 2. Fatores de virulência. 3. Diarréia.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Sérgio Schenkman

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. José Daniel Lopes

ANDRESA ZAMBONI

ESTUDOS GENÉTICOS SOBRE A VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA ATÍPICA

Presidente da Banca:

Prof. Dr. _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

*Aos meus pais **Higino** e **Rosana**, que me ensinaram a viver com dignidade, respeito e valorizar meus ideais. Por me ensinarem a enfrentar as dificuldades e superar os desafios. Por todo carinho, apoio e crença em meus sonhos. Por inúmeras vezes, abdicarem de seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus,.....*

Dedico

*Ao meu irmão **Alexandre**, por todo apoio, amor, e confiança. Por todos os momentos em que juntos, compartilhamos nossos medos, angústias e muitas alegrias. Por você estar sempre ao meu lado, por ser um grande amigo e por ter a certeza que estaremos sempre juntos.....*

Dedico

*Aos meus queridos avós **Natalino e Maria Eda** (in memoriam), pelo exemplo de força, honestidade, perseverança, determinação. Muito obrigada por terem compartilhado comigo os anos mais importantes de minha vida.....não há um único dia em que eu não pense em vocês. Saudades.....*

*Ao meu grande e eterno amor **Ricardo Corrêa Marcondes**, por todo apoio, paciência, constante dedicação e incentivo. Pelo enorme carinho e amor desprendidos a mim. Pelo papel fundamental em que exerceu durante a conclusão deste trabalho, por acreditar em meus sonhos, por estar ao meu lado em todos os momentos.....*

Dedico com muito amor esta tese

A **Profa. Dra. Isabel Cristina Affonso Scaletsky**, excelente pesquisadora e orientadora. Por ter me recebido em seu laboratório, pelos conhecimentos científicos transmitidos e por todas as oportunidades ao longo destes anos. Pela paciência, por ter acreditado em minha capacidade e sempre exigir o melhor e que desta forma contribuiu para o meu crescimento profissional e pessoal.

Muito obrigada

À Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado de São Paulo (**FAPESP**)
pelo apoio financeiro para
realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À *Sandra Hilde Fabbricotti*, pela amizade, alegria, grande incentivo e por todo apoio científico e pessoal, durante os anos da realização deste trabalho.

À grande amiga *Katia Regina Aranda*, por sua amizade, companheirismo, confiança e grande apoio em todos os momentos, durante esses muitos anos de convivência. Por ter vivenciado comigo momentos tão importantes de minha vida.

À *Profa. Dra. Marilis do Valle Marques*, pelo importante auxílio, conhecimentos transmitidos, por seu apoio e paciência.

À *Profa. Maria Cecília Campos*, por ter acreditado em mim e ser a grande responsável pelo início de minha vida científica.

À *Profa. Maria Juditte Bittencourt Fernandes*, minha “mestra”, por ter me incentivado e conduzido pelo caminho da ciência, foi por seus ensinamentos e amor à pesquisa, que segui por este caminho.

À *Profa. Dra. Márcia Regina Machado dos Santos*, pelo auxílio no sequenciamento.

À grande amiga *Michelle V. Dulguer*, pela valiosa amizade, compreensão, constante apoio científico e pessoal, e por todos os momentos que compartilhamos juntas durante esse caminho.

À amiga *Bianca Bragato*, pelo constante apoio, incentivo e alegria contagiante, por ter transformado nosso local de trabalho em um ambiente de amizade e companheirismo.

Aos amigos *André L. Bachi* e *Rodrigo Hernandes*, por todo apoio científico e pessoal, e pela grande amizade.

Aos amigos, *Suzely C. Montanino*, *Elaine C. Delpra*, *Beatriz C. Manoel*, *Lúcia M. Lopes*, *Joel Mendes*, *Sérgio Suzart*, por todo apoio e por terem compartilhado comigo várias emoções, durante a realização deste trabalho e pela valiosa amizade.

A *Magda* e *Paola*, pela amizade, sugestões e grande eficiência na secretaria da Disciplina de Microbiologia.

A *Sueli*, *Edvan* e *Flávio*, pela convivência, dedicação e colaboração constante durante todos esses anos.

A *Beatriz Schnabel*, *Ana Carolina Padovan* e *Aparecido*, por terem colaborado por várias vezes na realização de experimentos.

Aos *professores* e *funcionários* da Disciplina de Microbiologia da Universidade Federal de São Paulo.

Ao meu tio *Sidney Ferrari* e a toda minha *amada família*, por terem compartilhado com paciência e otimismo todos os momentos importantes, durante a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada

Assim eu vejo a vida

(Cora Coralina)

*"A vida tem duas faces:
Positiva e negativa
O passado foi duro
mas deixou o seu legado
Saber viver é a grande
sabedoria
Que eu possa dignificar
Minha condição de mulher,
Aceitar suas limitações
E me fazer pedra de segurança
dos valores que vão
desmoronando.
Nasci em tempos rudes
Aceitei contradições
lutas e pedras
como lições de vida
e delas me sirvo
Aprendi a viver."*

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histopatologia de EAEC	4
1.2. Fatores de virulência envolvidos na patogênese de EAEC	5
1.2.1. Adesinas e outros fatores de virulência codificados por genes plasmidiais	5
1.2.2. Toxinas	8
1.2.3. Fatores de virulência codificados por genes cromossômicos	10
1.3. Potencial papel pró-inflamatório dos fatores de virulência de EAEC	12
1.4. Regulação gênica em EAEC	13
1.5. EAEC atípica	13
2. OBJETIVO	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Amostras bacterianas	17
3.2. Condições de cultivo das amostras bacterianas	18
3.3. Determinação do sorogrupo das amostras bacterianas	18
3.4. Reação da polimerização em cadeia (PCR)	19
3.5. Extração de DNA plasmidial	20
3.5.1. Extração em pequena escala (“mini-prep”)	20
3.5.2. Extração em larga escala (“maxi-prep”)	20
3.6. Extração de DNA genômico	21
3.7. Determinação da concentração de DNA	21
3.8. Eletroforese de DNA em gel de agarose	22
3.9. Eluição dos fragmentos de DNA de gel de agarose	22
3.10. Reações de digestão de DNA	22
3.11. Reações de ligação de DNA	22
3.12. Transformação bacteriana	23
3.12.1. Transformação através de eletroporação	23
3.12.2. Transformação através de choque térmico	24
3.13. Conjugação bacteriana	24
3.14. Cura plasmidial	25
3.14.1. Cura plasmidial com alaranjado de acridina	25
3.14.2. Cura plasmidial com novobiocina	25
3.15. Transferência de DNA de células bacterianas para filtros de papel Whatman-“Colony-blotting”	25

3.16. Transferência de DNA de gel de agarose para membrana de nylon – “Southern- blotting”	26
3.17. Marcação radioativa do fragmento sonda	27
3.18. Hibridização de DNA com sondas radioativas	27
3.18.1. Hibridização dos filtros de papel Whatman	27
3.18.2. Hibridização das membranas	28
3.19. Seqüenciamento e análise das seqüências de DNA	28
3.20. Determinação da resistência a drogas antimicrobianas	29
3.21. Testes de hemaglutinação	29
3.22. Teste de adesão a células HEp-2	30
3.22.1. Cultivo das células HEp-2	30
3.22.2. Realização do teste de adesão	31
3.23. Curva de crescimento	31
3.24. Microscopia eletrônica de transmissão	31
3.25. Eletroforese de proteínas em SDS-PAGE	32
3.25.1. Extração de proteínas por lise	32
3.25.2. Extração de proteínas por aquecimento	32
3.25.3. Extração de proteínas de membrana externa	33
3.25.4. Eletroforese em SDS-PAGE	33
3.25.5. Seqüenciamento da região N-terminal	34
3.26. Métodos estatísticos	34
4. RESULTADOS	38
4.1. Características das amostras de EAEC atípicas	38
4.2. Análise do perfil plasmidial das amostras de EAEC atípicas	38
4.3. Estudos realizados com as amostras MA691-2 e RN153-1	39
4.3.1. Padrão de resistência a drogas antimicrobianas	39
4.3.2. Pesquisa de hemaglutininas	39
4.4. Identificação dos genes envolvidos no padrão AA da amostra MA691-2	39
4.5. Identificação dos genes envolvidos no padrão AA da amostra RN153-1	40
4.5.1. Construção de biblioteca genômica em vetor cosmídeo	40
4.5.2. Análise dos clones cosmídeos quanto a adesão a células HEp-2	41
4.6. Análise do clone cosmídeo pVIII-F-1	41
4.7. Mutagênese do clone pVIII-F-1 com o transposon mini-Tn 10	42
4.8. Análise dos mutantes obtidos através da mutagênese com o mini-Tn 10	42
4.9. Seleção do fragmento <i>Bam</i> HI de 3 Kb contendo o mini-Tn 10	44
4.10. Seqüenciamento do clone pAZ2	44
4.11. Análise da seqüência de 1.244 pb e da proteína deduzida	45
4.12. Análise da seqüência de 899 pb e da proteína deduzida	46
4.13. Prevalência da seqüência genética homóloga a proteína ygjV nas amostras de EAEC atípicas	46

4.14. Ensaio preliminar para caracterização fenotípica da adesina AA da amostra RN153-1	47
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÃO	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8. ANEXOS	103
ARTIGO ORIGINADO A PARTIR DESTE TRABALHO	

RESUMO

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é um patógeno emergente, associado à doença diarréica, que apresenta como característica o padrão de adesão agregativo (AA) a superfície de células HEp-2. O fenótipo AA está associado à presença de um plasmídeo de 65 MDa, conhecido como plasmídeo pAA, detectado através de uma sonda genética denominada de CVD432 ou simplesmente AA. Algumas amostras de EAEC, entretanto, apresentam o padrão AA, mas não são portadoras do plasmídeo. No plasmídeo pAA estão presentes vários genes relacionados com as propriedades de virulência, dentre os quais aqueles que codificam as adesinas fimbrias AAF (“Aggregative Adherence Factor” - AAF/I, AAF/II e AAF/III), o regulador de transcrição AggR, a proteína antiagregação (Aap) e as toxinas Pet e EAST1. Outros fatores de virulência de EAEC são codificados por genes cromossômicos, entre eles, a enterotoxina ShET1, o sideróforo Yersiniabactin (*irp2*), uma ORF críptica (*Shf*), e uma α -hemolisina.

A maioria dos estudos sobre mecanismos de virulência de EAEC compreende amostras que apresentam o padrão AA e que reagem com a sonda AA, ou seja, as amostras de EAEC típicas. Pouco se conhece sobre a presença de potenciais fatores de virulência em amostras de EAEC sonda-negativas, descritas por nós como EAEC atípicas.

Neste estudo analisamos 28 amostras de EAEC atípicas isoladas de crianças com diarréia (N = 18) e sem diarréia (N = 10) provenientes de várias cidades brasileiras quanto à presença de seqüências genéticas associadas aos fatores de virulência codificados no plasmídeo pAA e no cromossomo.

A maioria das amostras era portadora de dois ou mais genes de virulência, sendo a média dois; porém, duas amostras controles foram negativas para todos os marcadores de virulência pesquisados. Os genes *astA*, *pet*, *shf*, *shET1/pic*, *irp2* e *hly* foram encontrados mais freqüentemente em amostras isoladas de casos do que de controles. Quatro amostras apresentaram o gene *aggR* e em uma delas foi encontrado também as seqüências genéticas *aafA* e *aap*. A combinação dos genes *astA* e *shf*, foi encontrada em 16 (57%) amostras e 7 (25%) amostras eram portadoras das seqüências genéticas *astA*, *shf* e *irp2*.

Entre as amostras estudadas, os marcadores genéticos codificados por genes plasmidiais, *astA*, relacionada a produção de EAST1, e *shf* associada a uma ORF críptica, foram os mais freqüentes (61%) e apresentaram uma freqüência significativamente maior nos casos do que nos controles estudados ($P = 0,003$ e $P = 0,020$, respectivamente).

A maioria das amostras de EAEC atípicas estudadas reagiu com um dos 175 antissoros utilizados, sendo que alguns desses, como os sorogrupos O42, O126 e O162 foram os mais freqüentes e encontrados apenas nas amostras isoladas de casos.

A análise do perfil plasmidial de 12 amostras isoladas de crianças com diarréia mostrou a presença de mais de um plasmídeo de alto peso molecular na maioria das amostras estudadas. Duas amostras, uma contendo apenas um plasmídeo e uma outra sem nenhum plasmídeo foram então selecionadas para caracterização dos genes envolvidos no padrão AA.

A amostra RN691-2 portadora de um único plasmídeo e apresentando resistência antimicrobiana múltipla, foi submetida a experimentos de transformação, conjugação e cura, não sendo possível a obtenção de um transformante, transconjugante ou mesmo a amostra isogênica sem o plasmídeo.

Com o objetivo de identificar o(s) gene(s) envolvidos no padrão AA da amostra RN153-1, sem nenhum plasmídeo, foi construída uma biblioteca genômica e identificado um clone-cosmídeo, designado pVIII-F-1, que apresentou o padrão AA em células HEp-2 de maneira semelhante à amostra selvagem. Para localizar o gene necessário para a adesão, o clone cosmídeo foi submetido a mutagênese com o transposon mini-Tn10 (Cm^R), sendo identificado o mutante pVIII-F-1::Tn10, que havia perdido a capacidade de aderir. Tanto o clone-cosmídeo quanto o mutante foram mapeados em seus sítios de restrição e um fragmento de 3 kb *Bam*HI contendo 1 kb do mini-Tn10 ainda mantendo funcional a resistência a Cm foi novamente ligado, originando o sub-clone pAZ2.

A análise da seqüência de nucleotídeos do clone pAZ2 tem em seu total 2.197 pb, sendo 953 pb referentes ao gene de *cat* e 1.244 pb referentes às seqüências obtidas, constatando-se homologia de 97% com uma permease (proteína de membrana interna) de *Escherichia coli* K12, uma proteína hipotética denominada ygjV, presente na amostra protótipo de *E. coli* uropatogênica CFT073, em outras *E. coli* e bactérias enteropatogênicas. O peptídeo deduzido dessa região revelou uma identidade de 91%

com o COG0477 (família das permeases facilitadoras) e 98% de identidade com a altronato hidrolase de *Shigella flexneri*

Ensaio de microscopia eletrônica de transmissão da amostra RN153-1 após coloração negativa mostraram a presença de estruturas fimbriais, embora, nenhuma proteína tenha sido observada com evidência nos extratos totais e nos aquecidos da referida amostra.

Concluindo, os resultados obtidos em nosso trabalho mostraram que a maioria (71%), das amostras de EAEC atípica, apresenta pelo menos dois dos fatores de virulência envolvidos na patogênese das EAEC típicas. Entre eles, EAST1 e Shf foram os mais prevalentes (61%), sendo encontrados significativamente associados com diarreia.

Na caracterização preliminar dos genes envolvidos no fenótipo AA da amostra RN153-1, foi identificado um mutante não aderente a células HEp-2, apresentando inserção de mini-Tn10. A análise da sequência do DNA flanqueado pela inserção do mini-Tn10 levou a identificação de uma região a qual apresentou homologia com uma permease, que parece estar envolvida no processo de transporte de íons e outros eletrólitos na célula bacteriana. A identificação dos determinantes genéticos da adesina AA da amostra RN153-1, entretanto, merece ainda maiores investigações.

ABSTRACT

Escherichia coli enteroaggregative (EAEC) is emerging as a significant diarrheal pathogen. EAEC is defined by its characteristic “stacked brick” aggregative adherence (AA) pattern of adherence to HEp-2 cells. Most EAEC strains harbor a 60 to 65-MDa virulence plasmid (pAA). A 1-Kb fragment of pAA, referred to as the AA probe or CVD432, has been widely used for epidemiological studies. The pAA also encodes AA fimbriae (AAF) I, II, and III; the transcriptional activator AggR; enteroaggregative heat-stable enterotoxin 1 (EAST1); a 104-KDa cytotoxin designated Pet; the cryptic secreted protein Shf; and a novel antiaggregation protein (dispersin) encoded by the *aap* gene. In addition to the pAA plasmid, some EAEC strains express putative virulence factors that are encoded on the chromosome, including a 116-KDa secreted mucinase (Pic), yersiniabactin (Irp2), and the *E. coli* α -hemolysin (α -Hly). *Shigella enterotoxin 1* (ShET1) is encoded by the antisense strand of the *pic* gene.

Few studies have evaluated the prevalence of EAEC markers in probe-negative strains, reported by us as atypical EAEC. By using atypical EAEC strains isolated in a case-control study, we assessed the prevalence of putative virulence factors, such as AAF/I, AAF/II, AAF/III, AggR, Aap, EAST-1, Pet, Shf, ShET1/Pic, Irp2, and α -Hly, in an attempt to identify their roles as enteric virulence factors.

The majority of strains carried two or more of the genes, with two being the modal value; but two strains isolated from a control did not test positive for any of the factors. The AAF, *aggR*, and *aap* genes were present in only a minority of strains. The *astA*, *pet*, *shf*, *ShET1/pic*, *irp2* and *hly* genes were found more frequently in the patients than in the controls. The combination *astA* and *shf* was found in 16 strains (57%), followed by 7 strains (25%) possessing the combination *astA*, *shf*, and *irp2*.

The common virulence markers found in strains included the Pet, EAST1, Shf, Irp2, ShET1/Pic, and Hly virulence markers. EAST1 and Shf were the most frequently detected markers (61%) in strains and were found to be significantly associated with diarrhea ($P = 0,003$ and $P = 0,020$, respectively).

The majority (75%) of the EAEC isolates reacted with one of the antisera used. It was interesting that the strains belonging to serogroups O42, O126 and O162 were detected only in children with diarrhea.

Plasmid analysis of 12 strains isolated from diarrhea showed that the majority of strains contained large plasmids. Two strains, one carrying only one plasmid (MA691-2) and another one any plasmid (RN153-1), were chosen for genetic studies on the identification of genes responsible for the AA phenotype.

Plasmid from MA691-2 strain was transferred to *E. coli* K12 and no transformant or transconjugant harboring the plasmid or isogenic derivative strain lacking the plasmid was identified.

A genomic cosmid library of EAEC RN153-1 was generated in *E. coli* K12, and the resulting clones were screened for aggregative adherence to HEp-2 cells. One cosmid clone, pVIII-F-1, exhibited the same adherence as the wild-type, albeit to a lesser extent. Transposon mutagenesis was utilized to identify the region of cosmid pVIII-F-1 responsible for the aggregative phenotype. Plasmid pBSL181 carrying mini-Tn10::Cm was electroporated into *E. coli* DH5 α (pVIII-F-1), and isolates were selected on L agar with cloranfenicol and ampicillin. One isolate resistant to ampicillin and cloranfenicol (pVIII-F-1::Tn10) was chosen for further analysis. Subsequent mapping of both cosmid and mutant using restriction enzymes generated a 3 kb *Bam*HI fragment containing 1 Kb of Tn10 (including the cloranfenicol resistance gene). This fragment was subcloned and the resultant plasmid designated pAZ2 was sequenced.

The DNA sequence of 2,197 bp of pAZ2 contained 953 pb of cloranfenicol gene and 1,244 pb whose sequence was 97% homologous to a permease of *E. coli* K12, a hypothetical protein called *ygjV* presented in prototype uropathogenic *E. coli* strain CFT073 and others pathogenic *E. coli* and enteric pathogens. The predicted protein product of this region showed 91% identity to the COGO477 and 98% to the altronato hidrolase of the *Shigella flexneri*.

Electron microscopy assays showed the presence of fibrillar structures on the surface of strain RN153-1, but no predominant protein was seen in crude fimbrial preparations of this strain obtained through whole-cell lysates or heat extracts.

In conclusion, the majority (71%) of atypical EAEC strains carried at least two virulence factors mediating typical EAEC pathogenesis. EAST1 and Shf were the most frequently (61%) detected and were found to be significantly associated with diarrhea ($P = 0.003$ and $P = 0.020$, respectively).

In a preliminary characterization of genes involved in the AA phenotype of RN153-1 strain, we identified one mutant markedly deficient in HEp-2 cell adherence. Sequence analysis of the gene disrupted in this mutant revealed a region exhibit up to

97% amino acid similarity to a permease which seems to be involved in the process of transport of ions and other electrolytes in the bacterial cells. Nevertheless, the genes required for the AA phenotype remains unidentified.

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbico facultativo mais predominante da flora do intestino grosso de seres humanos e de alguns animais, estabelecendo uma relação comensal com o hospedeiro. Nos seres humanos, as amostras comensais de *E. coli* usualmente não causam doença no trato intestinal ou em sítios extra-intestinais. Entretanto, no hospedeiro debilitado ou no imunodeprimido, ou, ainda, quando as barreiras gastrointestinais são violadas, essas amostras podem causar infecções. Estas infecções podem ser tanto intestinais, como a diarreia, ou extraintestinais no caso das infecções do trato urinário, meningite ou septicemia (Nataro & Kaper, 1998; Levine et al., 1984). Algumas cepas da espécie, contudo, podem causar diarreia em indivíduos saudáveis, se apresentarem um conjunto específico de fatores de virulência, ausentes nas amostras comensais de *E. coli* (Kaper et al., 2004).

As amostras de *E. coli* que causam infecções intestinais, atualmente designadas de *E. coli* diarreiogênicas, são divididas em seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC). Esta classificação tem por base as propriedades de virulência, tipos de interações com as linhagens celulares e as manifestações clínicas que causam (Nataro & Kaper, 1998). Além do mais, os vários patótipos de *E. coli* tendem a formar grupos clonais que são caracterizados pelos seus antígenos O (lipopolissacarídeo, LPS) e H (flagelo) que definem os sorogrupos (somente o antígeno O) ou sorotipos (antígenos O e H) (Nataro & Kaper, 1998; Whittam, 1993).

E. coli enteroagregativa (EAEC) foi descrita em 1985, reconhecida por sua capacidade de aderir a monocamadas de células HEp-2 em cultura em um padrão de adesão agregativa (AA). No padrão AA, as bactérias apresentam-se aderidas umas às outras, à superfície das células epiteliais, bem como à superfície da lamínula na ausência de células, numa configuração semelhante a “tijolos empilhados”, formando agregados heterogêneos ou distribuindo-se em forma de cordões (Figura 1).

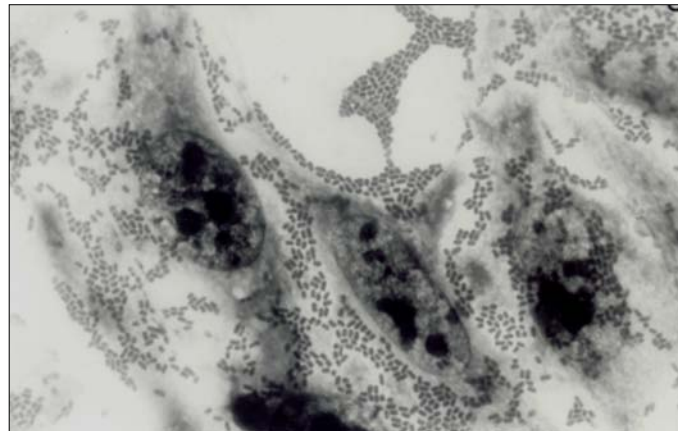


FIGURA 1. Padrão de adesão agregativa (AA) apresentado pela EAEC MA691-2 a células HEp-2 em ensaio de 3 horas.

O padrão AA, distinto dos padrões de adesão apresentados pela EPEC e DAEC, foi inicialmente associado significativamente à diarreia entre crianças da cidade de Santiago, no Chile em 1987 (Nataro et al., 1987). Estudos realizados com duas amostras protótipos, EAEC 17-2 e EAEC 042 mostraram que o fenótipo AA está associado à presença de plasmídeos entre 55 MDa e 65 MDa, denominados pAA (Nataro et al., 1985; Vial et al., 1988). Posteriormente, Baudry et al. (1990), demonstraram, um fragmento *Sau3A* de 1 kb, críptico, do plasmídeo pAA presente na amostra 17-2 que foi utilizado no desenvolvimento de uma sonda genética EAEC específica e variavelmente sensível, para distinguir EAEC das demais *E. coli*. Muitos estudos epidemiológicos têm utilizado esta sonda, denominada de CVD432 ou simplesmente AA, como também a presença do fenótipo AA através do teste de adesão, na detecção de amostras de EAEC (Huppertz et al., 1997; Germani et al., 1998; Scaletsky et al., 2002a; Okeke et al., 2003).

Desde a sua descoberta, um número crescente de estudos relacionaram a EAEC como causa de diarreia nos mais variados cenários (Chan et al., 1994; Wilson et al., 2001; Kawano et al., 2004). Atualmente, estes estudos incluem a diarreia endêmica em crianças tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento (Okeke & Nataro, 2001; Huang & DuPont, 2004; Huang et al., 2004), a diarreia persistente entre

indivíduos com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Gassama-Sow et al., 2004) e a diarreia dos viajantes (Gascón et al., 1998; Adachi et al., 2001). Vários surtos epidêmicos de diarreia por EAEC também foram descritos (Levine et al., 1988; Haider et al., 1991; Scaletsky et al., 2002b). Estudos prospectivos sugerem que em populações bem nutridas de países industrializados, a EAEC poderia ser uma causa de diarreia endêmica esporádica. Recentemente, um amplo estudo prospectivo de vigilância no Reino Unido apontou a EAEC como o principal patógeno em todas as faixas de idade (Wilson et al., 2001).

A implicação de EAEC em surtos epidêmicos de diarreia confirmou o fato de que pelo menos algumas amostras que apresentam o fenótipo AA sejam verdadeiros patógenos humanos, mesmo que nem todos os estudos tenham encontrado a EAEC associada significativamente à diarreia (Germani et al., 1996; Scaletsky et al., 2002b; Batista et al., 2004). Estudos mais recentes têm procurado identificar os genes pertinentes à virulência das amostras de EAEC, para melhor identificar as verdadeiramente patogênicas.

A manifestação clínica da infecção por EAEC compreende uma diarreia aquosa, com a presença ocasional de sangue e muco (Baron, S., 2000). Vários estudos mostraram que pacientes infectados com amostras de EAEC apresentam inflamação intestinal, observando-se a presença de lactoferrina fecal e citocinas inflamatórias, notadamente a interleucina IL-8 (Steiner et al., 1998; Greenberg et al., 2002).

Em um estudo realizado com voluntários, Nataro et al. (1995) descreveram que de quatro amostras sonda-positivas, apenas uma, a protótipo 042, provocou diarreia em voluntários, confirmando que nem todas as amostras de EAEC são igualmente patogênicas. Estudos realizados com esta amostra propuseram três características principais para a patogênese de EAEC (Figura 2): (1) aderência abundante à mucosa intestinal, (2) produção de enterotoxinas e citotoxinas e (3) indução de inflamação da mucosa intestinal (Harrington et al., 2006).

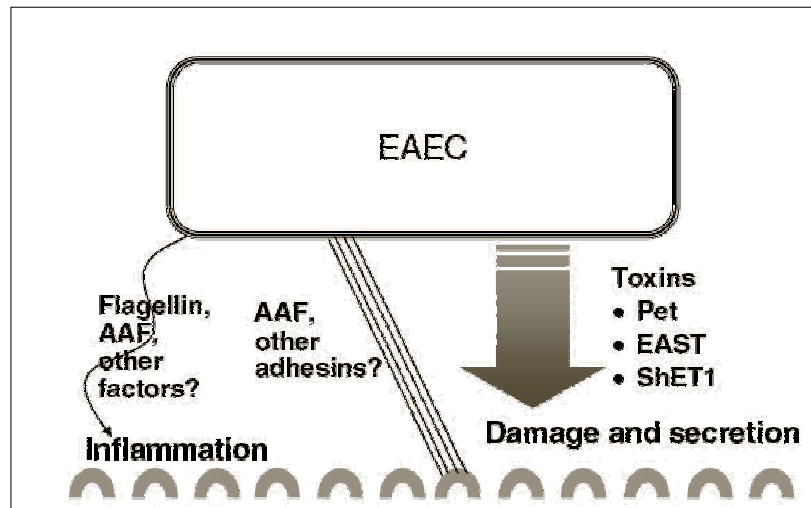


FIGURA 2. Fatores de virulência envolvidos na patogênese de EAEC. Fonte: Harrington et al. (2006)

1.1. Histopatologia de EAEC

Em modelos animais e pacientes infectados, EAEC parece ser capaz de colonizar as regiões do íleo e cólon do trato intestinal sem danos aparentes à mucosa do intestino delgado. A EAEC adere aos tecidos intestinais de forma agregativa em associação com uma espessa camada de muco (Tzipori et al., 1992; Hicks et al., 1996). A aderência é seguida por toxicidade da mucosa, que inclui dilatação da cripta, vesiculação das microvilosidades e extrusão da célula epitelial (Hicks et al., 1996; Nataro et al., 1996). Tipicamente, EAEC induz, um aumento da secreção de muco na mucosa intestinal, sendo que as bactérias ficam emaranhadas nesta espessa camada de biofilme. A formação desse biofilme, possivelmente, está envolvida com a capacidade de colonização da bactéria, causando má-absorção de nutrientes e a doença persistente (Nataro & Kaper, 1998; Steiner et al., 1998).

Estudos utilizando biópsias do cólon de crianças mostraram que algumas amostras de EAEC induzem encurtamento das vilosidades intestinais, necrose hemorrágica do topo das vilosidades e uma resposta inflamatória branda, com edema e infiltração mononuclear. A extrusão de enterócitos foi também evidenciada (Knutton et

al., 1992; Hicks et al., 1996). A amostra protótipo 042 também provocou efeitos citotóxicos em células T84 (originárias de carcinoma intestinal humano) polarizadas *in vitro*, induzindo vesiculação das microvilosidades, exfoliação de células da monocamada, aumento de vacuolização e separação nuclear do citoplasma circundante (Nataro et al., 1996) (Figura 3). Esta histopatologia ainda não foi observada em infecções em seres humanos. Ainda não foi descrito infiltrado de leucócitos polimorfonucleares na infecção humana por EAEC (Vial et al., 1988).

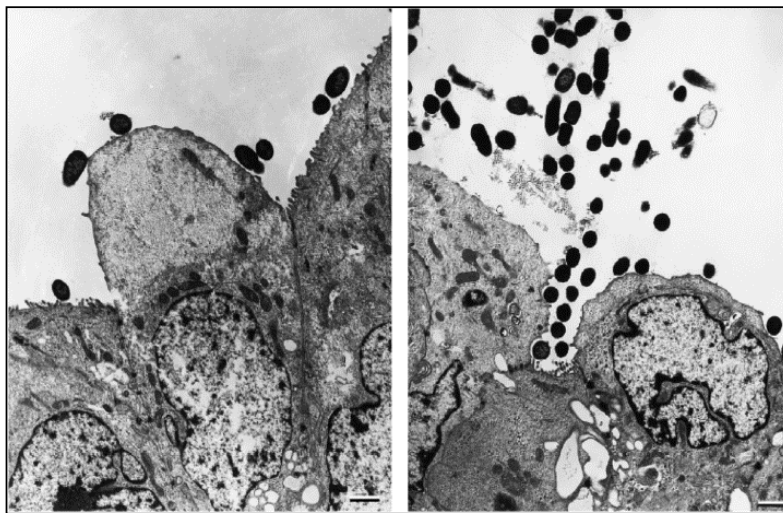


FIGURA 3. Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando a interação da EAEC 042 com monocamadas de células T84. Fonte: Nataro et al., 1998.

1.2. Fatores de virulência envolvidos na patogênese de EAEC

1.2.1. Adesinas e outros fatores de virulência codificados por genes plasmidiais

Os fatores de aderência melhor estudados em EAEC são as adesinas fimbriais AAFs (“aggregative adherence fimbria), codificadas nos plasmídeos pAA. Até o momento, foram descritas três diferentes AAFs: AAF/I, AAF/II e AAF/III. Estas adesinas são capazes de mediar o fenótipo AA nas amostras 17-2, 042 e 55989, respectivamente (Nataro et al., 1992; Czeczulin et al., 1997; Bernier et al., 2002).

AAF/I é uma estrutura fimbrial de 2 a 3 nm de diâmetro, organizada em feixes flexíveis. Esta adesina foi inicialmente identificada na amostra 17-2 e promove a

aderência AA a células HEp-2 e a capacidade de aglutinar eritrócitos humanos. Os genes que codificam para AAF/I estão localizados no pAA em duas regiões separadas por um fragmento de DNA de 9 kb (Nataro et al., 1993).

A região 1 contém os genes necessários para a síntese, *aggA* (pilina), e montagem, *aggC* (usher) e *aggD* (chaperonina), da fímbria, e um gene sem função determinada, *aggB*. Mediante a construção de uma proteína de fusão entre “maltose-binding protein” e AggA, inferiu-se que o produto de AggA está relacionado à subunidade estrutural de AAF/I, correspondendo a uma proteína de 14 kDa (Savarino et al., 1994). Os genes relacionados à biogênese de AAF/I presentes na região 1 apresentam o arranjo típico de um operon da família Dr (Nataro & Kaper, 1998).

O seqüenciamento da região 2 evidenciou uma ORF (“open reading frame”) relacionada à expressão de AAF/I, denominada AggR (Nataro et al., 1994). AggR apresenta homologia com reguladores positivos da expressão de fímbrias de *E. coli*, que são membros da família AraC de proteínas que ligam DNA (Nataro et al., 1994).

AAF/II, inicialmente descrita na amostra protótipo 042, mede aproximadamente 5 nm de diâmetro e é geneticamente distinta de AAFI (Nataro et al., 1985; Vial et al., 1988; Nataro et al., 1995). Os genes que codificam AAF/II estão localizados em duas regiões separadas. Na região 2, está o gene que codifica para o “usher”, *aafC* e, na região 1, separada por um fragmento de 15 kb, estão os genes estruturais *aafA*, a chaperonina *aafD*, e o ativador de transcrição *aggR* (Elias et al., 1999). A proteína codificada por *aafA* possui 17 kDa e apresenta homologia com AggA (25% de identidade e 47% de similaridade), a proteína estrutural de AAF/I. Na posição “downstream” a *aafC*, foi revelado um “cluster” com três ORFs, transcritas na mesma direção e com 93% de identidade a um “cluster” de genes localizados no plasmídeo de *Shigella flexneri* (Nakata et al., 1992). O primeiro gene deste “cluster” é uma ORF denominada *shf*. Este gene codifica para uma proteína de função não conhecida, que apresenta uma identidade de 25% com o aminoácido IcaB de *Staphylococcus epidermidis*, que está relacionado com a adesão intercelular (Heilmann et al., 1996).

As AAFs também possuem um gene, *aafB*, que codifica para uma provável proteína com função de invasina, portanto mediando a invasão do epitélio celular (Bernier e LeBouguéneq, 2002). Alguns pesquisadores sustentam a hipótese de que EAEC seria um patógeno invasor, contudo, a amostra protótipo 042 comprovadamente não se mostrou invasora nos estudos *in vitro* (revisado por Harrington et al., 2006).

As seqüências de aminoácidos, deduzidas a partir das seqüências de nucleotídeos dos genes envolvidos com a biogênese de AAF/I e AAF/II, apresentam similaridade com as proteínas relacionadas à biogênese das adesinas pertencentes à família Dr (Nataro et al., 1998). A família Dr de adesinas é composta de adesinas fimbriais e afimbriais, expressas por *E. coli* relacionadas com infecções do trato intestinal e urinário, que apresentam como receptor comum o antígeno eritrocitário do grupo sanguíneo Dra, presente na molécula “decay-accelerating factor” (DAF) (Nowicki, et al., 1990). DAF é uma glicoproteína de membrana citoplasmática, ancorada via glicosil fosfatidilinositol, que está amplamente distribuída nas células hematopoiéticas, tecidos endoteliais e epiteliais e atua na regulação da cascata do sistema complemento, pela via alternativa, protegendo esses tecidos dos danos celulares desencadeados pela ativação de C₃ (Nowick et al., 1990; Garcia et al., 1996).

Apesar das AAFs não reconhecerem o receptor Dr e apresentarem uma organização genética distinta, Dal’Agnol (2002) mostrou que essas adesinas podem ter suas seqüências de aminoácidos alinhadas com as da família Dr, sugerindo que as mesmas sejam incluídas nesta família.

AAF/III foi identificada na amostra 55989, proveniente de diarréia persistente, em um paciente adulto portador de aids. Essa fímbria é caracterizada por estruturas longas e flexíveis, com aproximadamente 3 a 5 nm de diâmetro, distintas de AAF/I e AAF/II (Bernier et al., 2002). O sequenciamento dos genes envolvidos na biogênese de AAF/III revelou similaridade com os operons *agg* e *aaf* (AAF/I e AAF/II, respectivamente). A região 1 compreende os genes *agg3D* (chaperonina), *agg3C* (*usher*), *agg3B* (membro da família de invasinas) e *agg3A* (subunidade estrutural). Na região 2, encontra-se o gene já descrito *aggR* (ativador da transcrição) e na região 3 foi encontrado um gene muito similar a *astA*, que codifica a toxina EAST1 (“enteroggregative heat-stable enterotoxin”).

A expressão dos genes AAF requer *AggR*, um ativador de transcrição da família AraC (Nataro et al., 1994). Esta proteína regula os genes envolvidos na biogênese das adesinas AAF/I e AAF/II. Estudos genéticos do plasmídeo pAA revelaram uma pequena ORF localizada “upstream” ao gene *aggR* na maioria das amostras de EAEC. Esse gene codifica uma proteína secretada de 10 kDa, que foi reconhecida pelo soro de voluntários após inoculação oral da amostra protótipo 042. Amostras desprovidas (“knocked-out”) deste gene apresentaram um único fenótipo hiperagregativo, e a microscopia eletrônica dessas amostras revelou um colapso das fímbrias AAFs na

superfície da bactéria. O produto desse gene foi denominado Aap (“antiaggregation protein”), e esta foi chamada de dispersina (Sheikh et al., 2002). A dispersina é secretada na superfície de amostras de EAEC e liga-se não covalentemente ao lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa. Dados mais recentes sugeriram que o mecanismo de ação da dispersina seria mediado predominantemente por sua capacidade de neutralizar a forte carga negativa do LPS, permitindo, assim, que as AAFs que carregam uma forte carga positiva fiquem livres para se espalhem na superfície, ligando-se a sítios distantes (revisado por Harrington et al., 2006).

Nishi et al. (2003) demonstraram que a secreção da dispersina requer cinco “clusters” de genes, localizados no plasmídeo pAA, porém não ligados ao gene *aap*. Esse “cluster” de genes inclui genes homólogos a permeases (ATPase e ABC), sugerindo a presença de um complexo transportador ABC. O segundo gene desse complexo, *aatA*, codifica uma estrutura homóloga a TolC, canal de membrana externa, facilitando assim a entrada do substrato na célula (Nataro, 2005).

O regulon *AggR* não é restrito ao plasmídeo pAA. Dudley e Nataro (revisado por Harrington et al., 2006) observaram que, além de regular genes do plasmídeo pAA, *AggR* também regula um operon cromossômico inserido numa ilha de patogenicidade no *locus pheU*.

Adesinas não fimbriais foram também observadas em amostras de EAEC pertencentes a diferentes sorogrupos. Monteiro-Neto et al. (2003) identificaram uma OMP de 58 kDa com propriedades hemaglutinantes, em amostras de EAEC pertencentes ao sorotipo O111:H12. Demonstrou-se, também, a presença de uma OMP de 18kDa, em amostras de EAEC pertencentes aos sorotipos O44:H18 e O126:H27, envolvida na formação de uma película em meio líquido (Chart et al., 1995). Esta OMP de 18 kDa é antigenicamente similar à subunidade protéica de uma fímbria apresentada por amostras de *Salmonella enteridis*. Spencer et al. (1998) demonstraram que a expressão dessa OMP também ocorria em amostras de EAEC de outros sorotipos, mas somente naquelas que hibridizavam com a sonda AA.

1.2.2. Toxinas

Diversos tipos de toxinas foram detectadas em sobrenadantes de cultura de algumas amostras de EAEC. Eslava et al., (1993) identificaram no sobrenadante de cultura de amostras de EAEC isoladas de dois surtos de diarreia em hospitais no México, duas proteínas de 108 e 116 kDa, pertencentes à família de proteínas autotransportadoras serina-proteases (SPATE) (“Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae*”) (Henderson et al., 1998). Esse grupo de proteínas se caracteriza por possuir um domínio C-terminal conservado, que forma um poro na membrana externa bacteriana, por onde a proteína madura é transportada.

A proteína de 108 kDa foi designada de Pet (“Plasmid encoded toxin”) (Eslava et al., 1993). A amostra protótipo 042 que expressa Pet provocou efeitos citotóxicos em células T84 polarizadas *in vitro*, induzindo dilatação das criptas e seu arredondamento, vacuolização subnuclear e ruptura celular com extrusão nuclear, enquanto que o mutante isogênico em *pet* promoveu anormalidades em uma escala significativamente menor (Henderson et al., 1999). Estudos sugerem que os efeitos tóxicos de Pet sejam devido a rearranjos do citoesqueleto seguidos da clivagem mediada por Pet de uma proteína do citoesqueleto, a espectrina (Villaseca et al., 2000; Canizalez-Roaman & Navarro-Garcia, 2003). Embora Pet tenha um papel na patogênese de EAEC, encontra-se presente numa minoria de amostras (Czeczulin et al., 1999); Pet apresenta alta homologia às proteases EspP de EHEC e EspC de EPEC (Stein et al., 1996; Eslava et al., 1998).

Ao estudar o sobrenadante da cultura da amostra protótipo 17-2 em câmaras de Ussing, Savarino et al. (1991) observaram a presença de atividade enterotoxigênica relacionada com alteração do transporte de íons. A substância secretada correspondia a uma proteína de baixo peso molecular, codificada pelo plasmídeo pAA e parcialmente termo-estável, que foi denominada EAST1 (“Enteraggregative heat-stable toxin 1”). EAST1 apresenta homologia significativa com o domínio enterotóxico da toxina Sta de ETEC e com a guanilina, um peptídeo endógeno ativador natural da guanilato ciclase (Savarino et al., 1993). Com base nessa homologia e devido à elevação dos níveis de cGMP, inferiu-se que EAST1 atua ativando a guanilato ciclase da mesma forma que a toxina STa e a guanilina. O papel de EAST1 na patogênese da diarreia é questionável, uma vez que voluntários inoculados com amostras que expressavam EAST1 não desenvolveram diarreia (Nataro et al., 1995). A seqüência *astA*, envolvida na expressão

de EAST1, mostra-se presente em somente uma minoria de amostras de EAEC e tem sido encontrada em outras categorias de *E. coli* diarreio gênica e também em *E. coli* não patogênica (Savarino et al., 1996; Zhou et al., 2002).

Além de EAST1, foi descrito que as EAEC podem secretar uma toxina termo-lábil de 120 kDa antígenicamente relacionada à α -hemolisina de *E. coli*. Essa toxina induzia uma elevação de cálcio intracelular e estimula a fosforilação de proteínas, na presença de cálcio (Baldwin et al., 1992); o seu papel, no entanto, como fator de virulência, não foi ainda definido.

1.2.3. Fatores de virulência codificados por genes cromossômicos

A terceira enterotoxina que poderia contribuir para a diarreia por EAEC, é a ShET-1 codificada cromossomicamente. Os genes *setBA*, que codificam ShET1 estão localizados na fita antisenso a *pic*, que codifica uma proteína secretada de 116 kDa, descrita por Navarro-Garcia et al. (1998). A toxina ShET-1 é codificada no cromossomo por duas ORFs, *set1A* e *set1B*, que codificam para as subunidades A e B, respectivamente. As duas organizam-se em uma estequiometria similar ao da toxina colérica, ou seja, uma subunidade A juntamente com cinco subunidades B. ShET1 promove acúmulo de fluido no modelo de alça intestinal ligada de coelho e aumento na diferença de potencial e na corrente de curto circuito quando testado em câmaras de "Ussing". (Fasano et al., 1995).

Pic ("protein involved in intestinal colonization") é uma proteína extracelular de 109,8 kDa codificada por genes cromossômicos da amostra protótipo 042 e por *S. flexneri*. Pic é sintetizada como uma molécula precursora de 146,5 kDa, que é processada durante sua secreção, liberando uma proteína madura de 109,8 kDa no sobrenadante da cultura bacteriana. A seqüência de aminoácidos desta proteína também revelou alta homologia com a família de proteínas SPATEs (Henderson et al., 1998). Pic apresenta atividade mucinolítica *in vitro*, resistência ao soro, e hemaglutinação, mas seu papel na patogênese de EAEC ainda não foi comprovado (Henderson et al., 1999).

O locus *pic/setBA* não é exclusivo de EAEC, sendo também encontrado em *S. flexneri* 2a (Fasano et al., 1995) e em *E. coli* uropatogênica CFT073 (Heimer et al., 2004), com seqüências nucleotídicas com identidade de 99% e 96%, respectivamente,

quando comparadas com a EAEC 042. Estudos propõem que a prevalência deste *locus* possa estar associada a um possível papel na patogenicidade de EAEC (Harrington et al., 2006). Em EAEC, a prevalência de *pic/setA* varia entre 4,6% e 57% das amostras (Czeczulin et al., 1999; Okeke et al., 2000; Vila et al., 2000; Piva et al., 2003; Sarantuya et al., 2004), sendo associada à diarreia entre crianças da cidade de Brasília (Piva et al., 2003) e viajantes adultos da Espanha (Vila et al., 2000).

Resultados obtidos através do seqüenciamento do genoma da amostra protótipo 042 revelaram que o *locus pic/setBA* está inserido numa ilha de patogenicidade de 117 kb, por sua vez, inserida no *locus pheU* do RNAt. As seqüências que flanqueiam o *locus pic/setBA*, incluem elementos de seqüências de inserção (IS), IS911 e IS629 (Harrington et al., 2006). Uma ORF semelhante a uma IS, *perD*, e um gene fágico críptico L0015 estão localizados “downstream” a *pic* (Henderson et al., 1999). Al-Hasani et al. (2001) determinaram que o *locus pic/setBA* da amostra de *S. flexneri* YSH6000T está localizado numa ilha de patogenicidade (PAI) denominada *she* e inserido adjacente ao gene *pheV* do RNAt. Os elementos IS que flanqueiam *pic/setBA* em EAEC diferem daqueles encontrados dentro da PAI *she*, o que leva a crer, que a aquisição do gene *pic/setAB* tenha sido diferente para as duas espécies bacterianas.

Também inserido na ilha *pheU* encontram-se dois grupos de genes, Scl e ScII, de cerca de 20 kb cada um, sendo que o último deles está sob controle do ativador de transcrição AggR. ScII compreende 16 ORFS, designadas de *aaiA-P* (significando, ilha de patogenicidade ativada por AggR) (revisado por Harrington et al., 2006). Estudos moleculares revelaram um promotor dependente de AggR localizado *upstream* a *aaiA* e sugeriram que as 16 ORF seriam transcritas como um operon. Exceto para *aaiP*, que codifica putativamente uma chaperonina ClpB, nenhuma outra ORF codifica alguma outra proteína de função conhecida. A contribuição dos genes *aai* na patogênese de EAEC ainda é desconhecida, porém esses genes parecem não ter um papel na aderência da bactéria a superfícies abióticas ou as células epiteliais intestinais, como ocorre com os genes regulados por AggR descritos anteriormente (revisado por Harrington et al., 2006).

Duas outras ilhas de patogenicidade também foram reveladas no genoma da amostra 042. Uma delas, inserida no gene *glyU*, codifica um homólogo do sistema de secreção do tipo III ETT-2 da EHEC O157:H7. A outra contém genes para um regulador de transcrição e proteínas efetoras e está inserida em *selC*. Além dessas duas ilhas, uma outra, a ilha de patogenicidade de *Yersinia* contendo o gene do

sideróforo Yersiniabactin está presente na maioria das amostras de EAEC (Schubert et al., 1998).

1.3. Potencial papel pró-inflamatório dos fatores de virulência de EAEC

As infecções causadas por EAEC são acompanhadas de inflamação da mucosa intestinal mesmo na ausência de diarreia. Steiner et al. (2000) mostraram que os sobrenadantes dos cultivos destas bactérias possuem atividade pró-inflamatória mediada pela liberação de IL-8, que é induzida pela proteína flagelina de *E. coli*. A liberação de IL-8 atrairia neutrófilos para o sítio da infecção, causando em outras infecções intestinais secreção de fluido e ruptura da barreira epitelial (Madara et al., 1993; Sansonetti et al., 1999). Ainda, segundo Steiner et al. (2000) a atividade pró-inflamatória da flagelina também está presente em cepas de EPEC e EHEC, levando a crer que o flagelo possa desempenhar outros papéis, além da motilidade, na patogênese destas bactérias.

Steiner et al. (1998) também sugeriram um papel para os fatores codificados no plasmídeo na liberação de IL-8. Jiang et al. (2002) observaram que os níveis de IL-8 eram mais altos em pacientes infectados com amostras EAEC contendo os genes *aggR* e *aafA*, em comparação a pacientes infectados por amostras de EAEC negativas para esses fatores. Huang et al. (2004) demonstraram que amostras de EAEC albergando os fatores *aggR*, *aggA* e *aap* eram capazes de causar uma liberação de IL-8 maior que 100 pg/mL em células epiteliais intestinais não polarizadas (HCT-8), do que amostras de EAEC negativas para estes fatores. Em um estudo com células T84 polarizadas *in vitro* infectadas com a amostra 042, ocorreu liberação de IL-8 das células até mesmo quando estas células eram infectadas com a amostra 042 mutada em *FliC*, subunidade principal da flagelina. Observou-se que a liberação de IL-8 das células T84 polarizadas requeria o ativador *AggR* e a fímbria *AAF*, sendo que a liberação de IL-8 foi significativamente menor, quando as células eram infectadas com mutantes na subunidade fimbrial menor, *AafB* (Harrington et al., 2005).

A proteína *AafB* foi recentemente descrita como um homólogo de uma classe de proteínas com potencial função de invasiva em *E. coli* uropatogênica e DAEC (Bernier & Le Bouguéneq, 2002; Plancon et al., 2003; Cota et al. 2004). Plancon et al. (2003)

sugeriram que o fenótipo invasão estaria correlacionado a ligação da integrina $\beta 1$ na superfície celular.

1.4. Regulação gênica em EAEC

Para compreender o papel principal do gene *aggR* na regulação dos genes de virulência de EAEC, é necessário entender como a proteína é regulada por si mesma. Recentes estudos demonstraram que a proteína liga-se a sítios específicos ao lado do promotor no sítio 35. Um segundo sítio de ligação foi sugerido por “footprinting” do DNA, embora nenhum papel para este sítio possa ser demonstrado em estudos de expressão gênica (Harrington et al., 2006). Em virtude da autoativação desse gene, foi questionado como a expressão de *aggR* seria iniciada e terminada. Verificou-se que o “regulon” AggR é expresso preferencialmente na fase logarítmica do crescimento bacteriano em meios de cultura. Harrington et al. (2006) demonstraram que FIS, um regulador fase-dependente, contribui para a ativação de AggR e que o nível basal de AggR é controlado por ações repressivas de uma proteína H-NS associada a nucleóide. Dessa forma, o promotor *aggR* estaria sujeito a um esquema de regulação que asseguraria sua abundante e rápida expressão logo após entrar no trato gastrointestinal.

1.5. EAEC atípica

O teste de adesão a células HEp-2 continua sendo o diagnóstico diferencial para a categoria de EAEC (Nataro & Kaper, 1998). Em um grande número de amostras de EAEC, o padrão AA está associado à presença de plasmídeos pAA, esses apresentam homologia, indicando que são conservados entre diferentes amostras de EAEC (Vial et al., 1988; Baudry et al., 1990).

Uma sonda de DNA derivada de um fragmento crítico do plasmídeo pAA vem sendo amplamente utilizada na detecção de amostras de EAEC, a qual inicialmente mostrou ser 89% sensível e 99% específica (Baudry et al., 1990). Estudos mais recentes confirmaram a alta especificidade dessa sonda, porém mostraram que a sensibilidade variava entre 15% e 90% para amostras de EAEC de diferentes regiões

(Figura 4). Esses dados têm conseqüências importantes nas conclusões obtidas de estudos epidemiológicos que utilizam apenas a sonda AA na detecção de EAEC.

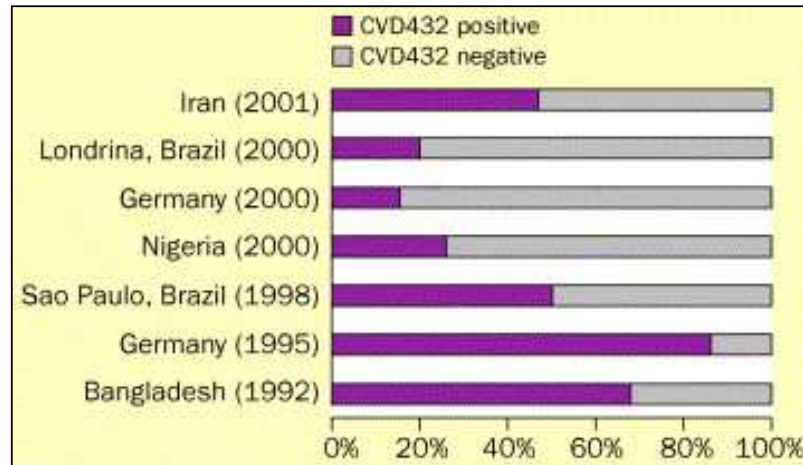


FIGURA 4. Proporção de amostras de EAEC isoladas de estudos reportados em Bangladesh (Faruque et al., 1992), Alemanha (Schmidt et al., 1995), São Paulo (Gomes et al., 1998), Nigéria (Okeke et al., 2000), Alemanha (Durrer et al., 2000), Londrina (Gioppo et al., 2000) e Iran (Bouzari et al., 2001), que hibridizaram com a sonda AA (Okeke & Nataro, 2001).

Estudos genéticos sobre virulência e estudos epidemiológicos têm sugerido que as EAEC sonda-positivas sejam as verdadeiramente patogênicas, sendo denominadas por alguns pesquisadores de EAEC típicas (Sarantuya et al., 2004; Kaper et al., 2004). Embora a enteropatogenicidade de amostras de EAEC sonda-positivas tenha sido relatada em vários estudos epidemiológicos e em voluntários humanos, a patogenicidade de pelo menos algumas amostras sonda-negativas é suportada pela evidência de estudos epidemiológicos que demonstraram associação entre amostras positivas e negativas, ou somente entre amostras sonda-negativas e a diarreia (Fang et al., 1995; Okeke et al., 2000). Além disso, surtos epidêmicos de EAEC por amostras sonda-negativas aconteceram na Europa oriental e Japão (Cobeljic et al., 1996; Ito et al., 1997).

Em um estudo multicêntrico sobre diarreia infantil realizado em várias cidades brasileiras foram isoladas 109 amostras de *E. coli* que apresentavam o padrão AA.

Destas 109 amostras, 81 hibridizaram com a sonda AA. As 28 amostras que não hibridizaram com a sonda AA, como também eram desprovidas de seqüências genéticas específicas para as demais categorias patogênicas de *E. coli* (EPEC, ETEC, EIEC e EHEC), foram classificadas como EAEC atípicas. Embora a diferença numérica entre as amostras isoladas de casos e controles não tivesse sido significativamente diferente, decidimos avaliar se dentro dessa população haveria possíveis enteropatógenos.

2. OBJETIVO

Para compreender melhor o potencial enteropatogênico das amostras de EAEC atípica, este trabalho teve como objetivos:

- Verificar a presença dos fatores de virulência envolvidos na patogênese de EAEC, codificados por genes plasmidiais e cromossômicos.
- Caracterizar novas adesinas envolvidas no fenótipo AA, mediante a identificação, clonagem, seqüenciamento e mutagênese dos genes envolvidos nessa adesão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras bacterianas

As amostras estudadas foram isoladas durante um estudo epidemiológico sobre diarreia em crianças menores de 2 anos de idade de baixo nível sócio-econômico, que foram atendidas no pronto socorro dos hospitais públicos, nas cidades de São Paulo, Joinville, Natal, Goiana e São Luiz entre agosto de 1997 a julho de 1999 (Scaletsky et al., 2002a). Este estudo epidemiológico compreendeu, originalmente, a análise de amostras de fezes de 338 crianças com diarreia aguda ou persistente (casos) e 322 crianças sem diarreia (controles), que compareceram aos hospitais por outros motivos que não a diarreia.

No referido estudo, em cada amostra de fezes foi pesquisada, por meio de métodos convencionais, a presença dos seguintes enteropatógenos: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp., *Cryptosporidium* spp. e rotavírus (Scaletsky et al., 2002a). Outrossim, de cada amostra de fezes semeada em ágar MacConkey foram selecionadas cinco colônias fermentadoras e uma outra não fermentadora de lactose, típicas de *E. coli*. Em seguida, foram realizados testes bioquímicos para confirmação da espécie, e as amostras foram armazenadas a -70°C, em caldo LB (item 8.1.1) acrescido de 15% de glicerol (Merck). Todas as amostras de *E. coli* foram submetidas a teste de adesão a células HEp-2, para caracterizar o padrão de adesão e hibridização de colônias com sondas genéticas específicas para a identificação das categorias de *E. coli* diarreio gênicas, isto é, relacionadas à produção de enterotoxinas de ETEC (sondas LT e ST), capacidade invasora de EIEC (sonda Inv), produção de toxinas de Shiga de STEC (sondas Stx1 e Stx2), produção de intimina e fímbria BFP de EPEC (sondas *eae* e *bfpA*), presença do plasmídeo de adesão de EAEC (sonda AA) e presença da seqüência *daaC* e adesina AIDA-I de DAEC (sondas *daaC* e AIDA-I).

Entre as 660 amostras de fezes analisadas, 109 (67 casos e 42 controles) apresentaram amostras de *E. coli* com o padrão de adesão agregativa (AA), sendo que 81 dessas amostras hibridizaram com a sonda AA. Entre as 28 amostras que não reagiram com a sonda AA, 5 amostras reagiram com a sonda *daaC*. Por serem

desprovidos de seqüências genéticas das outras sondas, esses 28 isolados foram classificados como EAEC atípicas. O número de isolados, em cada amostra de fezes, variou de um a cinco, mas para o presente estudo, somente um isolado de *E. coli* de cada uma dessas 28 amostras de fezes foi selecionado e considerado como uma amostra bacteriana.

As amostras de EAEC protótipos de expressão das adesinas fimbriais AAFs, 17-2 (AAF/I) (Nataro et al., 1995), 042 (AAF/II) (Czeczulin et al., 1997) e 55989 (AAF/III) (Bernier et al., 2002), e a EAEC 236 que expressa a proteína de membrana externa de 58 KDa (Monteiro-Neto et al., 2003) foram empregadas em alguns experimentos.

As características e origem das amostras de *E. coli* K12 e selvagens, bem como os vetores plasmidiais utilizados neste estudo, encontram-se na Tabela 1.

3.2. Condições de cultivo das amostras bacterianas

Todas as amostras foram cultivadas a 37°C em caldo ou ágar LB (item 8.1.1) ou ágar MacConkey. Os seguintes antibióticos foram adicionados, quando indicado: ampicilina, 100 µg/mL; tetraciclina 20 µg/mL; canamicina, 30 µg/mL; cloranfenicol, 25 µg/mL; estreptomicina 10 µg/mL; sulfonamida 300 µg/mL; ácido nalidíxico, 50 µg/mL. As soluções estoque de antibióticos foram preparadas em solvente apropriado, esterilizadas por filtração e mantidas a -20°C (Sambrook et al., 1989).

As culturas em meio líquido foram incubadas por 16 a 18 horas em condições estáticas ou, quando citado, sob agitação constante de 200 rpm.

Os estoques bacterianos foram mantidos em caldo LB (item 8.1.1), acrescidos de 15% de glicerol, e do antibiótico apropriado, e congelados a -70°C.

3.3. Determinação do sorogrupo das amostras bacterianas

A identificação do antígeno somático (O) foi realizada utilizando-se soros O1 a O175, adquiridos comercialmente (Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Espanha).

As amostras foram semeadas em 5 mL de TSB (Difco) e incubadas a 37°C por 18 horas. Após esse período, as amostras foram diluídas em solução salina com azida sódica (item 8.2.1) até atingir a concentração de $1,8 \times 10^9$ bactéria/mL. O crescimento bacteriano foi submetido à fervura durante 1 hora e, após o resfriamento das suspensões, foram adicionados 2 mL de solução formalizada a 0,5% contendo violeta genciana (item 8.2.2)

O antígeno, assim preparado, foi submetido a soroaglutinação em placas de 96 orifícios com os soros polivalentes (P1 a P24), diluídos 1:1. Após a incubação a 37°C por 24 h, a reação foi lida, em comparação ao controle positivo, em microscópio invertido. As suspensões antigênicas que aglutinaram com determinado soro polivalente foram submetidas a novos ensaios com os soros monovalentes respectivos, nas condições descritas.

3.4. Reação da polimerização em cadeia (PCR)

Os “primers” utilizados para a pesquisa dos determinantes genéticos das amostras estudadas estão relacionados na Tabela 2.

As reações de PCR foram todas realizadas em banho de gelo, utilizando-se tubos de polipropileno de 0,2 mL (Eppendorf®, Hamburg, Alemanha), onde foram colocados o DNA molde, obtido através de fervura de duas colônias bacterianas em 50 µL de água destilada esterilizada durante 5 minutos e os reagentes (Invitrogen, Life Technologies Inc, Gaithenesburg MD, EUA) nas seguintes concentrações: 1x tampão PCR, 1,5 mM MgCl₂ (50 mM), 2mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 pmoles de cada “primer”, 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase e 10 µL do DNA bacteriano, sendo o volume completado com 50 µL de água destilada estéril.

A seguir, os tubos foram colocados em um aparelho termociclador (modelo System 2400, Perkin Elmer Corporation, Norwalk, EUA) e a reação submetida a ciclos específicos de amplificação para cada par de “primers” (Tabela 2). Após a amplificação, os produtos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, comparando-se ao padrão de peso molecular “1Kb DNA ladder”.

3.5. Extração de DNA plasmidial

3.5.1. Extração em pequena escala (“mini-prep”)

A extração do DNA plasmidial foi realizada pelo método de Birnboim & Doly (1979).

As amostras bacterianas foram cultivadas em 3 mL de caldo LB (item 8.1.1), contendo o antibiótico apropriado, por 16 a 18 horas sob agitação constante. Em seguida, 1 mL das culturas foram transferidos para tubos de polipropileno e centrifugados por 2 minutos em microcentrífuga Eppendorf® a 12.000 rpm. Após centrifugação, os sobrenadantes foram desprezados, e as células foram ressuspensas em 100 µL de solução I (item 8.3.3). A seguir, foram adicionados 200 µL de solução II (item 8.3.4) e, após cuidadosa homogeneização, a suspensão foi incubada em banho de gelo por 5 minutos. Após a adição de 150 µL de solução III (item 8.3.5), a suspensão foi novamente incubada em banho de gelo por 10 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm, o sobrenadante foi coletado e o DNA precipitado em 2 volumes de etanol gelado. Os tubos foram homogeneizados lentamente e mantidos a –20°C por 1 hora. Após nova centrifugação, os tubos foram secos à temperatura ambiente e o DNA ressuspenso em 50 µL de tampão TE (item 8.3.8) contendo RNase A (Sigma-Aldrich, EUA) em concentração final de 20 µg/mL e incubados a 37°C por 30 minutos.

3.5.2. Extração em larga escala (“maxi-prep”)

O kit “Qiagen Plasmid Midi Kit” (Qiagen Inc., Califórnia, EUA) foi empregado para extração de DNA em larga escala, segundo as recomendações do fabricante.

As amostras foram cultivadas em 500 mL de caldo LB (item 8.1.1), contendo o antibiótico apropriado. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 6.000 rpm por 15 minutos a 4°C em centrífuga Sorvall RC2B (Sorvall, Newtown, EUA). Os sedimentos assim obtidos foram submetidos à extração de DNA, utilizando a coluna “Qiagen – tip 500”. Os sedimentos foram ressuspenso em 200 µL de tampão TE (item 8.3.8).

3.6. Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com Marmur et al. (1961).

A amostra bacteriana foi cultivada em 250 mL de caldo LB (item 8.1.1) e incubada com agitação a 37°C por 16-18 horas. A seguir, a cultura foi centrifugada a 5.000 rpm por 20 minutos e o sedimento ressuspense em 20 mL de solução para suspensão celular (item 8.4.1). Após incubação a 37°C por 5 minutos, foram adicionados 30 mL de solução de lise (item 8.4.2), sendo a solução homogeneizada e incubada a uma temperatura de 60°C por 2 horas. Para a extração das proteínas foram adicionados 12 mL de uma solução de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (item 8.3.7) e mantido a uma agitação vigorosa por 20 minutos. Após centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, a fase aquosa foi coletada e repetiu-se a extração com a mistura de solventes até não se observar mais a fase protéica. O DNA foi então precipitado com 0,6 volumes de álcool isopropílico e 20 mL de etanol 80% gelado, ressuspense em 20 mL de SSC 0.1X (item 8.7.3) acrescido de 1mg/mL de RNase A (Sigma-Aldrich, EUA). Após incubação a 37°C por 30 minutos, o DNA foi novamente precipitado por adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 6,0 e 2 volumes de etanol 95%. O DNA foi coletado com auxílio de um bastão de vidro e dissolvido em 3mL de tampão TE (item 8.3.8).

3.7. Determinação da concentração de DNA

Após extração, avaliaram-se a concentração e a pureza do DNA, segundo técnica descrita por Sambrook et al. (1989).

As soluções foram diluídas em 1:60 em água e as densidades ópticas foram determinadas em espectrofotômetro SmartSpecTM3000 (Bio-Rad, Califórnia, EUA) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. As leituras em 260 nm foram empregadas no cálculo da concentração de DNA em ng/μL ou μg/mL. A relação entre as leituras de 260 e 280 nm indicava a pureza da extração, quando os valores encontravam-se entre 1,8 e 2,0.

3.8. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os géis de agarose foram preparados dissolvendo-se a agarose (Invitrogen, Life Technologies Inc, Gaithenesburg MD, EUA) por aquecimento em tampão Tris-EDTA-Borato 0,5X (TBE) (item 8.5.1), na concentração final de 0,7%, exceto quando indicado.

As amostras de DNA analisadas foram misturadas a 5 µL de tampão de amostra para DNA 6X (item 8.5.2), obtendo-se um volume final de 20 µL em água, que foi aplicado nas canaletas do gel. Como marcadores de peso molecular foram utilizados DNA do bacteriófago λ digerido com *HindIII* (λ /*HindIII*) (Invitrogen) e “1 Kb DNA ladder”.

A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem máxima e constante de 100 Volts em tampão TBE 0,5X. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (5mg/mL) (item 8.5.3) por 10 a 15 minutos e observados em transluminador de luz ultravioleta (Fotodyne), para análise visual.

3.9. Eluição dos fragmentos de DNA de gel de agarose

Após separação e visualização dos fragmentos de DNA de interesse, estes foram eluídos do gel, empregando-se o kit “GeneClean II Kit” (Bio 101, Califórnia, EUA), segundo recomendações do fabricante.

3.10. Reações de digestão de DNA

As reações de digestão de DNA foram realizadas em um volume final de 20 µL, empregando-se as enzimas de restrição e seus respectivos tampões, segundo recomendações do fabricante (Invitrogen).

3.11. Reações de ligação de DNA

As ligações entre DNA do inserto e vetor plasmidial foram efetuadas com a utilização da enzima T4 DNA-ligase e o respectivo tampão de ligação (Invitrogen),

segundo recomendações do fabricante, seguindo a proporção molar 3:1 (inserto:vetor) em volume final de 20 µL. As reações foram incubadas por 18 horas a 16 °C.

3.12. Transformação bacteriana

As células bacterianas competentes foram transformadas através de choque térmico com DNA recombinante resultante das clonagens e através de eletroporação com DNA plasmidial de alto peso molecular das amostras selvagens.

Após a transformação, foram adicionados 800 µL de meio SOC (item 8.6.2) à reação, seguindo-se uma incubação por 1 hora sob agitação a 250 rpm. Em seguida, os cultivos foram plaqueados em diferentes volumes de 50 a 200 µL em ágar LB (item 8.1.1) contendo o antibiótico apropriado para seleção.

3.12.1. Transformação através de eletroporação

As células bacterianas competentes foram transformadas através de eletroporação, segundo metodologia descrita por Ausubel et al. (1989).

As células competentes de *E. coli* foram preparadas em água resfriada a 4°C e mantidas congeladas a -70 °C em alíquotas de 200 µL de solução de glicerol a 10%. Para a transformação, as células competentes foram descongeladas em banho de gelo e 1 µL de DNA plasmidial foi adicionado à alíquota de células competentes. Essa mistura foi transferida para cubetas apropriadas (0,2 cm Bio-Rad, Califórnia, EUA), previamente resfriadas, e, em seguida, foram eletroporadas através do eletroporador “Gene Pulser” (Bio-Rad), a 2,5 kV, 25 µF e controle de pulso de 200Ω. Após a eletroporação, foram adicionados 800 µL de meio SOC contendo 1 mM de IPTG (para induzir a expressão da transposase), e a mistura foi incubada a 37°C sob agitação durante 1 hora. A seguir, foram plaqueados cerca de 100 µL e 200 µL do cultivo, em ágar LB (item 8.1.1) contendo o antibiótico apropriado para seleção.

3.12.2. Transformação através de choque térmico

As células competentes foram preparadas em tampão FB (item 8.6.1). Uma colônia de *E. coli* foi semeada em 5 mL de meio LB e incubada sob agitação durante 18 horas a 37°C. Após o crescimento bacteriano, cerca de 3 mL foram semeados em 125 mL de meio LB. A mistura foi incubada sob agitação a 37°C até a DO₅₅₀ atingir valores entre 0,5 e 0,6. A cultura foi incubada durante 10 minutos no gelo e em seguida centrifugada por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C. Após ressuspensão em 20 mL de tampão FB, as células competentes foram alíquotadas em 250 µL em tubos de polipropileno e mantidas a -70°C até o momento do uso.

3.13. Conjugação bacteriana

A amostra bacteriana (doadora) e a receptora *E. coli* C600 foram cultivadas individualmente em 3 mL de caldo LB (item 8.1.1) a 37°C por 18 horas. Após o crescimento, ambas amostras, foram diluídas 1:100 no mesmo meio e crescidas sob agitação a 37°C, até atingirem a concentração de 3×10^8 células/mL. Foram adicionados 1 mL da amostra doadora e 1 mL da amostra receptora em um erlenmeyer de 25 mL contendo 1 mL de caldo LB. A mistura foi incubada a 37°C por 24 horas e plaqueada para a seleção dos transconjugantes.

Os transconjugantes foram selecionados em placas de ágar nutriente contendo ácido nalidíxico 100 µg/mL e as drogas correspondentes às marcas de resistência da amostra doadora.

A amostra foi diluída 1:100 e 1:10.000 em meio LB. Uma alíquota de 100 µL foi semeada em placas contendo o antibiótico apropriado, dependendo do perfil de resistência da amostra doadora. Como controle, as amostras doadora e receptora foram semeadas separadamente no mesmo meio que o da seleção. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. As colônias obtidas nas placas seletoras foram purificadas em placas contendo as mesmas drogas utilizadas para a seleção.

3.14. Cura plasmidial

3.14.1. Cura plasmidial com alaranjado de acridina

A amostra bacteriana foi cultivada em caldo LB (item 8.1.1) por 16 horas a 37°C. Após o crescimento, a cultura foi diluída até atingir a concentração de 10^5 bactérias/mL em caldo LB e incubada por 3 horas com agitação. A cultura em fase logarítmica foi diluída para uma concentração final de 10^4 células/mL (escala 5 de MacFarland). Alíquotas de 3mL da suspensão em salina foram distribuídas em tubos aos quais foi adicionado alaranjado de acridina (10 µg/mL) para as concentrações finais de 25, 50, 75, 100 e 125 µg/mL. Os tubos foram cobertos com papel alumínio e incubados a 37°C por 18 horas. O crescimento bacteriano ocorrido no tubo de maior concentração de alaranjado de acridina, foi semeado em placas contendo ágar MacConkey, de modo a se obter colônias isoladas. As colônias assim obtidas foram mantidas congeladas em caldo LB e glicerol para análises posteriores.

3.14.2. Cura plasmidial com novobiocina

O procedimento foi o mesmo utilizado no item 3.14.1, com a substituição do alaranjado de acridina por novobiocina na concentração de 500 µg/mL.

3.15. Transferência de DNA de células bacterianas para filtros de papel Whatman– “Colony- blotting”

As amostras de *E. coli* foram inicialmente semeadas em placas de ágar MacConkey pela técnica de semeadura de placa-mestre e incubadas a 37°C, entre 16 a 18 horas. Em cada placa foram incluídos controle positivo (*E. coli* K12 albergando o plasmídeo recombinante contendo com fragmento sonda utilizado no experimento) e controle negativo (*E. coli* K12 DH5α).

Em seguida, um papel de filtro Whatman nº 541 (Whatman, Nova Jersey, EUA), do mesmo diâmetro da placa, foi pressionado sobre as colônias a fim de transferi-las para os filtros, que foram incubados por 1 hora a 37°C.

Os filtros assim obtidos foram tratados segundo metodologia descrita por Grustein (1975), com algumas modificações. Inicialmente, os filtros secos à temperatura ambiente foram tratados com solução desnaturante (item 8.7.1), expostos a vapores de água fervente por 3 minutos e novamente tratados com solução neutralizante (item 8.7.2) por 5 minutos e mantidos à temperatura ambiente até ficarem completamente secos.

3.16. Transferência de DNA de gel de agarose para membrana de nylon – “Southern- blotting”

Os DNAs genômico e plasmidial foram transferidos do gel de agarose para membranas de nylon por capilaridade. Após a corrida eletroforética e visualização do DNA em luz ultravioleta, os géis foram fotografados com câmera Polaroid, com filme 667 (Polaroid Corporation, Cambridge, MA). O DNA no gel foi tratado com solução desnaturante (item 8.7.1) durante 45 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Em seguida, o gel foi lavado várias vezes em água destilada e tratado com solução de neutralização (item 8.7.2), nas mesmas condições utilizadas para a desnaturação.

A transferência por capilaridade foi realizada por 16 horas, no mínimo, segundo metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989), utilizando uma solução de SSC 6X (item 8.7.3) e membranas de nylon positivamente carregadas (Hybond-N, Amersham Biosciences, EUA). Após esse período, o sistema foi desmontado, e a membrana foi lavada em solução de SSC 2X (item 8.7.3) por 20 minutos sob agitação leve e seca à temperatura ambiente.

As membranas tiveram as regiões referentes às canaletas do gel marcadas com lápis e foram submetidas à imobilização por luz ultravioleta no aparelho para “cross linking UV” (UV Spectrolinker™XL1000, Spectroline, New York, USA), utilizando o parâmetro automático para imobilização de DNA em membranas de nylon.

3.17. Marcação radioativa de fragmento sonda

Os fragmentos sonda foram marcados com [α - 32 P]dCTP (Amersham Biosciences, EUA), com atividade específica de 3.000 Ci/mmol, pelo método de “random-primer extension” utilizando-se o kit “Ready To Go–DNA Labelling Beads” (dCTP) (Amersham Biosciences, EUA), segundo as recomendações do fabricante.

Os fragmentos de DNA em concentração de 25 ng em volume de 45 μ L de água destilada foram desnaturados a 100°C por 5 minutos e, em seguida, mantidos em gelo. Essa solução foi transferida para os microtubos do kit, que continham a mistura de marcação, e os tubos agitados delicadamente. Em seguida, 5 μ L de [α - 32 P]dCTP foram adicionados à mistura, e os tubos foram incubados a 37°C por 10 minutos. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 5 mL de EDTA pH 8,0 (0,2 M). A purificação dos nucleotídeos marcados não incorporados foi realizada em microcolunas de Sepharose G50 “ProbeQuant G50 microcolumns” (Pharmacia-Biotech, New Jersey, EUA), segundo as recomendações do fabricante. O fragmento sonda, assim obtido foi mantido a –20°C até o momento de sua utilização.

3.18. Hibridização de DNA com sondas radioativas

3.18.1. Hibridização dos filtros de papel Whatman

Os filtros contendo as colônias, obtidos conforme descrição no item 3.15 para detecção dos genes *pet* e *hly* (Tabela 3) em amostras de EAEC, foram colocados em sacos plásticos contendo solução de hibridização (item 8.7.4) durante 1 hora a 65°C, sob agitação lenta. Foram utilizados em média 5 mL da solução de hibridização por filtro. Em seguida, foram adicionados à solução de hibridização aproximadamente 10⁵ cpm/mL de sonda radioativa (item 3.17), previamente desnaturada a 100°C por 5 minutos. Os sacos plásticos foram selados e incubados sob agitação lenta, por 18 horas a 65°C. Após esse período, a solução de hibridização contendo a sonda radioativa foi retirada e os filtros transferidos para recipientes plásticos para lavagens posteriores.

Os filtros foram lavados 2 vezes durante 30 minutos a 65°C, sob agitação lenta, em SSC 0,1X (item 8.7.3), acrescido de 0,1% de SDS. A seguir, os filtros foram secos a temperatura ambiente e autoradiografados através da exposição a filmes de raios X Kodak “X-Omat-R” (Eastman Kodak Co Nova Jersey, EUA) em cassetes apropriados (Eastman Kodak Co.), contendo tela intensificadora, por no mínimo 24 horas a -70°C. O filme foi revelado em revelador Kodak automático de filmes de raios X em câmara escura.

3.18.2. Hibridização das membranas

As membranas de nylon contendo o DNA plasmidial e cromossômico foram colocadas em garrafas de vidro, que continham solução de hibridização “Rapid-hyb buffer” (Amersham Biosciences, EUA Pharmacia Biotech Inc, EUA) além de 100 µg/mL de DNA desnaturado de esperma de salmão (Gibco-BRL). Foi empregado o volume de 1 mL de solução de hibridização/cm² de membrana. Em seguida, foram adicionadas às membranas, aproximadamente 10⁵ cpm/mL da sonda marcada, previamente desnaturada a 100 °C por 5 minutos. As garrafas foram incubadas sob agitação lenta, por 1 hora a 65°C em forno de hibridização, e, em seguida, foi adicionada a sonda radioativa. Após nova incubação de 2 horas a 65°C, as membranas foram lavadas, secas e expostas a filmes de raios-X conforme descrito no item anterior.

3.19. Seqüenciamento e análise das seqüências de DNA

O seqüenciamento automático foi realizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano-USP, utilizando o sistema MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences, EUA). O DNA plasmidial, preparado segundo metodologia descrita no item 3.5.2, foi digerido com a enzima de restrição *Xho*I, para quantificação através do padrão de peso molecular DNA Mass Ladder (Invitrogen). Os “primers” utilizados para as reações foram sintetizados pela Promega (SC, Brasil) em escala de 25 nmoles.

Os programas SeqMan e MegAlign (DNASTAR) foram utilizados para alinhar continuamente as seqüências encontradas, formando “contigs”. Mediante o alinhamento múltiplo entre as seqüências foi possível localizar os sítios comuns e,

assim, a junção dos fragmentos de forma a se obter um fragmento único. Essas seqüências foram analisadas através do programa BLAST do “National Center for Biotechnology Information”. (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/;) (Altschul *et al.*, 1990).

3.20. Determinação da resistência a drogas antimicrobianas

Foi utilizada a técnica descrita por Bauer & Kirby (1966), utilizando-se discos de antibiótico de procedência Sensifar (Brasil). As drogas testadas e as concentrações dos discos foram as seguintes: ampicilina (100 µg/mL), canamicina (30 µg/mL), cefalotina (30 µg/mL), ciprofloxacina (5 µg/mL), cloranfenicol (25 µg/mL), estreptomicina (10 µg/mL), gentamicina (10 µg/mL), tetraciclina (20 µg/mL), sulfonamida (300 µg/mL) e ácido nalidíxico (50 µg/mL).

As amostras bacterianas foram cultivadas em 2 mL de caldo LB (item 8.1.1) e, após o crescimento correspondente à concentração de $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL, foram semeadas com “swab” estéril em placas de ágar Muller Hinton (Difco). Em seguida, os discos contendo as drogas antimicrobianas foram colocados sobre a superfície do ágar e as placas incubadas a 37°C por 18 horas.

A leitura foi realizada comparando o halo de inibição com os dados da tabela do fabricante.

3.21. Testes de hemaglutinação

Os testes de hemaglutinação foram realizados segundo a metodologia descrita por Evans *et al.* (1979). Foram utilizadas hemácias humanas do grupo A e de boi, coelho e carneiro. As hemácias foram lavadas 3 vezes com solução tampão salina fosfatada (PBS) (item 8.8.1) e uma suspensão de 3% de hemácias foi testada na presença e na ausência de 1 % de D-manose (item 8.8.5).

As amostras foram cultivadas em caldo de TSB (Difco) e incubadas por 18 horas a 37°C. Após o crescimento, as amostras foram semeadas em placas contendo meio Blood Agar Base (BAB) (Difco) e incubadas a 37°C até se observar o crescimento. Os testes foram realizados em placa de vidro quadriculada à temperatura ambiente. A

suspensão de hemácias (20 µL) foi misturada com uma quantidade de crescimento bacteriano, com auxílio de um palito de madeira e placa de vidro foi agitada manualmente para a observação da aglutinação (formação de grumos).

3.22. Teste de adesão a células HEp-2

O teste de adesão a células HEp-2 foi realizado segundo a metodologia descrita por Scaletsky *et al.* (1984), utilizando um único período de incubação. Para o teste as amostras foram cultivadas em 3 mL de caldo LB (item 8.1.1), a 37°C em cultura estática por 18 horas.

3.22.1. Cultivo das células HEp-2

O cultivo das células HEp-2 foi realizado em garrafas de plástico apropriado (Nalge Nunc, NY, EUA) contendo 10 mL de meio mínimo essencial de Eagle, modificado com sais de Earle (MEM) acrescido de soro fetal bovino 10% (MEM-SFB 10%) (item 8.8.2) e mantidas em estufa 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ por 3 a 4 dias. Após esse período, o meio de cultivo foi removido e a monocamada celular lavada com 4,5 mL de tripsina a 0,25% (item 8.8.3). Essa solução foi desprezada, adicionando-se em seguida, 5 mL de MEM-SFB 10%, sendo feitas pipetagens repetidas, para se obter uma suspensão celular homogênea.

O número de células viáveis foi determinado através do método de exclusão do corante azul Tripán a 0,5% (item 8.8.4) (Schrek, 1936). A suspensão obtida foi ajustada para uma concentração de 150.000 células/mL, através de diluição em MEM-SFB 10% e volumes de 1 mL foram transferidos para placas de 24 orifícios (Corning, Costar, EUA), contendo lamínulas de plástico 13 mm (Nalge Nunc, NY). A placa foi incubada a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas.

3.22.2. Realização do teste de adesão

As monocamadas celulares confluentes foram submetidas a duas lavagens com PBS (item 8.8.1) e acrescidas de 1 mL de MEM-SFB 2% contendo 1% de D-manose (item 8.8.5). Uma alíquota de 40 µL da cultura bacteriana foi inoculada sobre a monocamada celular e incubada em estufa a 37°C por 3 horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas 6 vezes com PBS, fixadas com 1 mL de metanol por 15 minutos e coradas com solução May-Grünwald (item 8.8.7) por 10 minutos e, a seguir, com uma solução de Giemsa (item 8.8.8) por 20 minutos. As lamínulas foram, então, lavadas com água corrente, secas, montadas sobre uma lâmina de vidro e observadas ao microscópio óptico comum.

3.23. Curva de crescimento

As amostras foram cultivadas em 2 mL de caldo LB (item 8.1.1) com os antibióticos apropriados por 16 horas a 37°C, sob agitação. A seguir, as culturas foram diluídas na razão 1:50 em 20 mL de caldo LB e incubadas por 30 minutos. Após esse período, a densidade óptica (DO) foi medida em 600 nm em espectrofotômetro SmartSpec™3000 (Bio-Rad, Califórnia, USA), sendo este considerado o tempo de crescimento zero. Esse procedimento foi repetido até completar 220 minutos, sendo realizadas leituras a cada 20 minutos.

3.24. Microscopia eletrônica de transmissão

Os ensaios para microscopia eletrônica foram realizados segundo Knutton (1995). As preparações foram realizadas e examinadas pela Dra. Cecília M. Abe no microscópio de transmissão eletrônica JEOL JEM 1200 EX II no Departamento de Bioquímica da Universidade de Birmingham, Reino Unido, operando a 80 kV.

As amostras bacterianas foram cultivadas em placas contendo ágar LB (item 8.1.1) por 16 a 18 horas a 37°C. As bactérias foram coletadas da placa com PBS 0,1 M (pH 7.2) (item 8.8.1), e 1 mL do crescimento foi transferido para microtubos de polipropileno e que foram centrifugados em microcentrífuga por 3 minutos a 14.000

rpm. O sedimento foi novamente centrifugado e ressuspensão em 50 µL de água destilada. A seguir, 10 µL da suspensão foi transferida para outro microtubo contendo uma solução de 10 µL de bacitracina (50 µg/mL) juntamente com 10 µL de molibdato de amônia a 2% . Após suave homogeneização, 10 µL da mistura foram aplicados em grades revestidas de carbono. Após 5 minutos de contato, o excesso de líquido foi removido com o auxílio de papel de filtro e as grades secas à temperatura ambiente.

3.25. Eletroforese de proteínas em SDS-PAGE

3.25.1. Extração de proteínas por lise

As amostras foram cultivadas em diferentes meios de cultura: ágar LB (item 8.1.1), ágar MacConkey, BAB e ágar Brucella com o antibiótico apropriado a 37°C durante 18 horas e ressuspensas em solução salina estéril (PBS pH 7.4) necessário para obtenção de turvação correspondente à concentração 4×10^8 bactérias/mL. A suspensão foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensão em 200 µL de tampão de amostra e aquecido a 100°C por 10 minutos e submetida a técnica de SDS- PAGE.

3.25.2. Extração de proteínas por aquecimento

As amostras foram cultivadas em ágar LB (item 8.1.1) e ágar MacConkey com o antibiótico apropriado a 37°C durante 18 horas e diluídas em PBS pH 7,4 (item 8.8.1) para obtenção de turvação correspondente a concentração 4×10^9 bactérias/mL. Alíquotas de 1 mL dessa suspensão foram centrifugadas a 2.500 rpm (250 g/s) por 10 minutos, e o sedimento foi ressuspensão em 160 µL de PBS pH 7,4. Após incubação, a 60°C por 30 minutos, o sobrenadante foi transferido para microtubos, adicionando-se, então, 40 µL de tampão de amostra (item 8.9.2). A mistura foi aquecida a 100°C por 10 minutos e analisada em gel de SDS- PAGE.

3.25.3. Extração de proteínas de membrana externa

A extração de proteínas de membrana externa foi realizada segundo metodologia descrita por Achtman et al., 1983.

As amostras bacterianas foram semeadas em 100 mL de caldo TSB a 37°C durante 16 a 18 horas, e centrifugadas em centrífuga Sorval RC 2B a 3.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. As culturas foram ressuspensas em 10 mL de Tris 10 mM pH 8,0, e as células lisadas por ultra-som em sonicador (Sonifier 450, Branson Ultrasonics Corp., Danbury) durante 80 segundos em ciclos de 50%. Após a centrifugação para remover as células que não foram rompidas, o sobrenadante foi coletado e centrifugado em ultracentrífuga (Beckman, rotor Ti50) por 60 minutos a 20.000 rpm (2.000 g/s) a 4°C. A cultura foi então ressuspensa em 150 mL de água destilada e tratada com 8 volumes de uma solução contendo 1,67% de N-lauroilsarcosina (Sigma-Aldrich, EUA) e 11,1 mM de Tris pH 7,6. Após 20 minutos à temperatura ambiente, a mistura foi novamente centrifugada em ultracentrífuga por 20.000 rpm a 20°C durante 90 minutos. O sedimento foi ressuspensa em 150 mL de PBS, e cerca de 10 mL dessa suspensão foram misturados a 10 mL de tampão de amostra 1x. A mistura foi aquecida em banho-maria a 100°C por 5 minutos e analisada em gel de SDS-PAGE.

3.25.4. Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese de proteínas foi realizada, como descrita por Laemmli et al. (1970), utilizando-se um gel de resolução 12% (item 8.9.4) e de empacotamento 5% (item 8.9.3). A eletroforese foi conduzida em tampão Tris-glicina (item 8.9.5) sob uma corrente de 25 mA durante aproximadamente 5 horas. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com uma solução de azul de Comassie R-250 (item 8.9.6) por 2 horas e descorado em solução descorante (item 8.9.7) por aproximadamente 12 horas até a visualização completa das bandas protéicas. O padrão de peso utilizado foi "Bench Mark Protein Ladder – Pre-stained" (Invitrogen, EUA).

3.25.5. Sequenciamento da região N-terminal

Após a separação eletroforética em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membranas de “polyvinylidene difluoride” (PVDF-Millipore) e visualizadas através de coloração com azul de Comassie R-250 (item 8.9.6). A seguir, a banda de interesse foi cortada da membrana e enviada para o serviço de seqüenciamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP. As seqüências N-terminais da proteína foram alinhadas com seqüências previamente conhecidas, presentes no GenBank, utilizando-se o programa BLAST.

3.26. Métodos estatísticos

As diferenças entre a prevalência das diferentes categorias de *E. coli* nas amostras provenientes de casos de diarreia e controles foram analisadas pelo uso do teste de Qui-quadrado χ^2 para cálculo do valor de p . O programa Epi-info 6.02 (Dean *et al.*, 1991) foi utilizado para realizar os cálculos. Um valor de $p < 0.001$ foi considerado significativo.

TABELA 1. Características de amostras de *Escherichia coli* e vetores plasmidiais utilizados neste estudo.

Amostra ou plasmídeo	Características relevantes ^a	Referência
DH5 α	<i>[supE44ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1]</i> (Nal)	Sambrook et al., 1989
HB101	<i>mcrB mrr hsdS20[r_B⁻m_B⁻] recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20 supE44;</i> <i>Escherichia coli</i> híbrida B/K-12 (Sm)	Boyer & Roulland-Dussoix, 1969
C600	<i>thi1 thr1 leuB6 lacy1 tonA21 supA21 supE44 hsdR</i> (Nal)	Sambrook et al., 1989
ORN103	<i>thr1 leu-6 thi1 lacY1 xyl-7, ara13 gal-6 tonA2 minA minB U169 recA13 Δfim</i> (Km)	Orndorff et al., 1985
pACYC184	Plasmídeo vetor de baixo número de cópias; 4,2 Kb (Cm, Tc)	Chang & Cohen, 1978
pHC79	Plasmídeo vetor cosmídeo; 6,5 Kb (Ap)	Hohn, B., 1979

^aAp, resistência a ampicilina; Cm, resistência a cloranfenicol; Km, resistência a canamicina; Sm, resistência à estreptomicina; Tc, resistência à tetraciclina; Nal, resistência a ácido nalidíxico.

TABELA 2. “Primers” utilizados na pesquisa de determinantes genéticos de virulência através de reações de PCR.

Determinante de Virulência	Propriedade codificada	Seqüência dos “primers” 5'----3'	Gene Amplificado	Fragmento amplificado (bp)	Referência bibliográfica
AAF/I	Subunidade de AAF/I	TTAGTCTTCTATCTAGGG AAATTAATTCCGGCATGG	<i>aggA</i>	450	Czeczulin et al., 1999
AAF/II	Subunidade de AAF/II	CATGCATGCAAAAAATCAGAATGTTTGT CGGGATCCATTTGTCAAGCTCAGC	<i>aafA</i>	550	Czeczulin et al., 1997
AAF/III	Subunidade de AAF/III	GTATCATTGCGAGTCTGGTATTGAG GGGCTGTTATAGAGTAACTTCCAG	<i>agg3A</i>	462	Bernier et al., 2002
EAST1	Enterotoxina EAST	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	<i>astA</i>	111	Yamamoto & Echeverria, 1991
AggR	Ativador de transcrição das AAFs	CTAATTGTACAATCGATGTA ATGAAGTAATTCTTGAAT	<i>aggR</i>	308	Czeczulin et al., 1999
Shf	Proteína secretada	ACTTTCTCCCGAGACATTTC CTTTAGCGGGAGCATTTCAT	<i>shf</i>	613	Czeczulin et al., 1999
ShET1/pic	Enterotoxina de <i>Shigella</i> /mucinasase	TCACGCTACCATCAAAGA TATCCCCCTTTGGTGTA	<i>shET1/pic</i>	1.100	Okeke et al., 2000
Irp2	Yersiniabactin	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTCCGGCAGCGTTTCTTCT	<i>irp2</i>	264	Schubert et al., 2000
Ap58	Proteína de membrana externa de 58 KDa	GGATGGCGCGGGTTTCAGAGG CCGCCGGGCATTTGTGAGA	<i>ap58</i>	591	Monteiro-Neto e al., 2003
F1A	Maior subunidade estrutural da fímbria do tipo 1	CAATCGTTGTTCTGTGCGCTCTCGGTC GAAGGTCGCATCCGCATTAGCA	<i>fimA</i>	527	Suzart, 2000

TABELA 3. Características das sondas genéticas utilizadas na pesquisa de determinantes genéticos de virulência associados com EAEC.

Sonda genética	Fator de virulência	Plasmídeo recombinante	Enzimas de restrição	Tamanho do fragmento (Kb)	Referência bibliográfica
<i>pet</i>	104 KDa Citotoxina	pCFN1	<i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I	3,9	Eslava et al., 1998
<i>hly</i>	α -hemolisina	pSF4000	<i>Ava</i> I	7,0	Welch et al., 1983

4. RESULTADOS

4.1. Características das amostras de EAEC atípicas

Foram estudadas 28 amostras de EAEC atípicas, sendo 18 provenientes de casos e 10 de controles, sendo que 21 (75%) pertenceram a 16 sorogrupos distintos (Tabela 4). A maioria das amostras era portadora de dois ou mais genes de virulência, sendo a média dois; porém, duas amostras controles foram negativas para todos os marcadores de virulência pesquisados. Os genes *astA*, *pet*, *shf*, *shET/1/pic*, *irp2* e *hly* foram encontrados mais freqüentemente em amostras isoladas de casos do que em controles. Quatro amostras apresentaram o gene *aggR* e em uma delas foi encontrado também a seqüência genética *aafA* e *aap*. A combinação dos genes *astA* e *shf*, foi encontrada em 16 (57%) amostras e 7 (25%) amostras eram portadoras das seqüências genéticas *astA*, *shf* e *irp2*.

A distribuição dos fatores de virulência entre amostras isoladas de casos e controles está apresentada na tabela 5. Os marcadores de virulência EAST1 e Shf foram os mais freqüentes, tendo sido ambos encontrados em 61% das amostras, e apresentaram uma freqüência significativamente maior nos casos do que nos controles estudados ($P = 0,003$ e $P = 0,020$, respectivamente).

4.2. Análise do perfil plasmidial das amostras de EAEC atípicas

Com o objetivo de identificar o(s) gene(s) envolvido no padrão AA, foram selecionadas 12 amostras de EAEC atípicas todas provenientes de crianças com diarreia; essas amostras foram negativas para a sonda *daaC*, e não apresentavam a seqüência genética pesquisada para o regulador de transcrição AggR. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para escolha da amostra de menor número ou ausência de plasmídeos.

A Figura 5 mostra a análise do perfil plasmidial das 12 amostras de EAEC atípicas. Oito amostras apresentaram diferentes plasmídeos de tamanho variados, duas apresentaram dois plasmídeos de alto peso molecular, uma amostra apresentou

apenas um plasmídeo de alto peso molecular, e apenas uma não possuía nenhum plasmídeo. Duas dessas amostras foram selecionadas para estudos posteriores: a amostra MA691-2 apresentando um único plasmídeo de alto peso molecular e a amostra RN153-1 sem nenhum plasmídeo.

4.3. Estudos realizados com as amostras MA691-2 e RN153-1

4.3.1. Padrão de resistência a drogas antimicrobianas

As amostras MA691-2 e RN153-1 foram analisadas quanto à resistência às seguintes drogas: ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida, gentamicina, ciprofloxacina, oflaxacina, ácido nalidíxico e canamicina. A amostra RN153-1 apresentou resistência apenas à tetraciclina e canamicina, enquanto que a amostra MA691-2 apresentou-se resistente à ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, estreptomicina e sulfonamida.

4.3.2. Pesquisa de hemaglutininas

A pesquisa de hemaglutininas foi realizada através de hemaglutinação manose-resistente (MRHA) com quatro tipos diferentes de hemácias, entre elas, hemácias de coelho, boi, carneiro e de origem humana do tipo A. Ambas as amostras MA691-2 e RN153-1 aglutinaram hemácias de carneiro e de boi. Somente a amostra RN153-1 aglutinou hemácias humanas e nenhuma das duas amostras aglutinou hemácias de coelho na presença de manose.

4. 4. Identificação do(s) gene(s) envolvido no padrão AA da amostra MA691-2

Inicialmente, a amostra MA691-2 foi utilizada como doadora nos experimentos de conjugação com a receptora *E. coli* C600, com seleção para as marcas de resistência presente na doadora mais ácido nalidíxico. Nenhum transconjugante foi obtido em qualquer uma das placas seletoras.

A seguir, o DNA plasmídial foi extraído da amostra MA691-2 e transferido por transformação para a *E. coli* DH5 α , com seleção para as marcas de resistência presentes na referida amostra. Não foi obtido nenhum transformante utilizando tanto a transformação mediante choque térmico quanto a transformação através de eletroporação.

Por último, foram feitas tentativas de curar o plasmídeo da amostra MA691-2, utilizando os tratamentos com alaranjado de acridina e novobiocina. A amostra MA691-2 foi cultivada na presença de diferentes concentrações de alaranjado de acridina, sendo que a maior concentração de alaranjado de acridina onde ainda ocorreu crescimento bacteriano foi de 100 $\mu\text{g/mL}$. Após semeadura em placa, foram analisadas 700 colônias quanto à resistência a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, estreptomicina e sulfonamida e nenhuma delas apresentou qualquer sensibilidade para qualquer uma dessas drogas. Cinco dessas colônias foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose, e todas apresentavam o plasmídeo de alto peso molecular, indicando que todos os genes de resistência estavam presentes nesse plasmídeo. Este mesmo procedimento foi realizado utilizando o tratamento com novobiocina na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ em substituição ao alaranjado de acridina e também foram observadas somente colônias resistentes a todas as drogas testadas.

4. 5. Identificação do(s) gene(s) envolvido no padrão AA da amostra RN153-1

4.5.1. Construção de biblioteca genômica em vetor cosmídeo

O vetor cosmídeo pH79 foi empregado na construção de uma biblioteca genômica da amostra RN153-1. Esse vetor pode ser empregado na clonagem de fragmentos de DNA entre 15 e 30 kb para obtenção de bibliotecas genômicas e plasmidiais (Datta et al., 1984).

O DNA genômico da amostra RN153-1 foi extraído e parcialmente digerido com a enzima *Sau3A*. Foram testados diferentes tempos de digestão e diferentes concentrações da enzima, a fim de gerar fragmentos entre 9 e 23 kb. Ao final, escolheu-se a reação de digestão de 1 hora e 45 minutos com a enzima diluída na razão 1:10 que apresentou maior número de fragmentos entre a faixa de 9 e 23 kb

(Figura 6). Esses fragmentos foram ligados ao vetor cosmídeo pH79 linearizado com *Bam*HI. Após a reação de ligação, o DNA foi empregado no encapsulamento *in vitro* do bacteriófago λ , utilizando o kit “Gigapack III Gold” (Stratagene, EUA) segundo as recomendações do fabricante e transfectado em *E. coli* DH5 α .

Para a transfecção, as células competentes obtidas através de choque térmico foram descongeladas em banho de gelo e 3 μ L do DNA ligado foram adicionados a 200 mL de células competentes. Os transductantes obtidos foram selecionados em placas de ágar LB contendo 100 μ g de ampicilina.

Foram selecionadas 960 colônias que apresentavam resistência à ampicilina, designadas clones cosmídeos, que foram cultivadas em placas de 96 orifícios contendo caldo LB acrescido de ampicilina e glicerol e mantidas a -70°C. A Figura 7 ilustra o perfil plasmidial de 7 clones cosmídeo após digestão com a enzima de restrição *Bam*HI.

4.5.2. Análise dos clones cosmídeos quanto à adesão a células HEp-2

Dos 960 clones obtidos, foram testados 880 quanto à adesão a células HEp-2. Um clone recombinante, designado pVIII-F-1, apresentou o padrão AA em células HEp-2 de maneira semelhante a amostra selvagem RN153-1 (Figura 8).

4.6. Análise do clone cosmídeo pVIII-F-1

O clone cosmídeo pVIII-F-1 foi analisado quanto a presença das seqüências genéticas *astA* e *shf* apresentadas pela amostra selvagem RN153-1. Também foi pesquisado o gene *ap58* que codifica uma proteína de membrana externa de 58 kDa envolvida na adesão AA de amostras de EAEC do sorotipo O111:H12 (Monteiro-Neto et al., 2003). Como mostra a Figura 9, o clone pVIII-F-1 não apresentou nenhum produto de PCR para os três genes pesquisados.

Um outro estudo realizado com o clone pVIII-F-1 foi verificar qual o papel da fímbria tipo 1 na adesão AA apresentada pelo mesmo. Para tanto, a amostra de *E. coli* OR103 (Δ *fim*) foi transformada por eletroporação com o plasmídeo pVIII-F-1. As 31

colônias obtidas que apresentavam resistência à ampicilina foram testadas quanto à adesão a células HEp-2, sendo verificado que todas apresentavam a capacidade de aderir (dados não mostrados).

Com o objetivo de delimitar a região do clone pVIII-F-1 responsável pelo fenótipo AA, o DNA plasmidial foi extraído e mapeado através de digestão com diversas enzimas de restrição, entre elas, *EcoRI*, *HindIII*, *Sall*, *PstI*, *Clal*, *BamHI*, *EcoRV*, *XbaI*, *Scal*, *SphI*, *HincII*, *SmaI*, *BglII* e *PvuI* (Figura 10). A fim de subclonar fragmentos de DNA do cosmídeo foi realizado um “Southern blotting”, utilizando o vetor pHc79 como sonda genética.

O tamanho do inserto foi então calculado em 21,5 kb através do corte com a enzima *EcoRI*, sendo observados 3 fragmentos de tamanhos aproximados entre 11, 9 e 1,5 kb (Figura 11). Após eletroforese em gel de agarose 0,7% os três fragmentos foram cortados do gel, eluídos e subclonados em vetor pACYC184 linearizado com a enzima *EcoRI* (Figura 12).

Os três subclones obtidos foram testados quanto à capacidade de aderir a células HEp-2. Os três subclones não apresentaram nenhuma adesão.

4.7. Mutagênese do clone pVIII-F-1 com o transposon mini-Tn10

O mini-transposon Tn10 que alberga um cassete de cloranfenicol (*cat*) foi utilizado na construção de um banco de mutantes do cosmídeo pVIII-F-1 na tentativa de identificar os genes envolvidos no fenótipo AA.

O clone pVIII-F-1 foi mutagenizado através de transformação por eletroporação com o plasmídeo pBSL181, que alberga o transposon mini-Tn10. Foram obtidas 250 colônias que apresentavam resistência à ampicilina e ao cloranfenicol.

4.8. Análise dos mutantes obtidos através da mutagênese com o mini-Tn10

Todos os clones do banco de mutantes foram testados individualmente quanto à adesão a células HEp-2, sendo identificados 8 mutantes não aderentes.

O DNA plasmidial desses 8 mutantes foi extraído e submetido à digestão com a enzima *EcoRI*. A análise da eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de DNA

obtidos mostrou dois perfis de digestão distintos, indicando serem apenas dois mutantes diferentes (Figura 13). Os mutantes 20I e 15II foram selecionados para experimentos posteriores.

Para confirmar se os dois mutantes possuíam apenas uma cópia do mini-*Tn10*, o DNA plasmidial foi extraído e submetido à “Southern blotting” após digestão com as diferentes enzimas de restrição *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Scal* e *Bgl*II, utilizando como sonda o gene de resistência a cloranfenicol. A análise do “Southern blotting” mostrou a presença de apenas uma banda radioativa, indicando a presença de uma única cópia do transposon inserido no DNA plasmidial (Figura 14). No mutante 20II, o mini-*Tn10* estava inserido em fragmentos de DNA de aproximadamente 1 kb até 9 kb. No mutante 15II, o mini-*Tn10* inseriu-se em fragmentos de 3 a 9 kb, sendo escolhido para experimentos de clonagem. Este mutante foi denominado pVIII-F-1::*Tn10*. A Figura 15 ilustra a adesão deste mutante a células HEp-2.

Em seguida, foi realizada uma comparação da velocidade de crescimento do mutante pVIII-F-1::*Tn10* em relação ao cosmídeo pVIII-F-1. A curva de crescimento mostrou um crescimento semelhante para ambas as amostras, com crescimento ligeiramente maior do mutante em relação ao cosmídeo após 140 minutos de incubação (Figura 16). Esses dados indicam que a perda do fenótipo AA apresentada pelo mutante estaria relacionada possivelmente à interrupção de um gene envolvido na biogênese da adesina e não por uma eventual redução de seu crescimento.

A seguir, foi feita uma estimativa do sítio de inserção do mini-*Tn10* no clone cosmídeo pVIII-F-1. Para tanto, o DNA plasmidial do mutante pVIII-F-1 foi comparado ao DNA do cosmídeo após digestão com diferentes enzimas de restrição, entre elas, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Scal* e *Bgl*II (Figura 17). Foram encontrados fragmentos de DNA de tamanhos variados contendo o mini-*Tn10*: *Bam*HI de 3 kb, *Eco*RI de 5 kb, *Hind*III de 5,0 kb, *Pst* de 6,5 kb, *Scal* de 6,5 kb e *Bgl*II de 7,0 kb (Figura 18). Foi selecionado o fragmento *Bam*HI de 3 kb para experimentos de subclonagem e sequenciamento.

4.9. Seleção do fragmento *Bam*HI de 3 kb contendo o mini-*Tn*10

O mutante pVIII-F-1::*Tn*10 foi submetido à digestão com *Bam*HI e novamente ligado. A mistura de ligação foi transformada em *E. coli* DH5 α e as colônias selecionadas em ágar LB contendo ampicilina e cloranfenicol. As colônias resistentes à ampicilina e cloranfenicol foram analisadas em gel de agarose, sendo possível identificar uma delas contendo apenas o fragmento *Bam*HI de 3 kb (Figura 19). Esta colônia denominada de clone pAZ2 foi escolhida para o seqüenciamento.

4.10. Seqüenciamento do clone pAZ2

O inserto de aproximadamente 3 kb foi submetido à reação de seqüenciamento, utilizando um conjunto de “primers”, “forward” (Fcat) e “reverse” (Rcat), desenhados a partir da seqüência do gene de resistência a cloranfenicol, gene *cat* e um conjunto de “primers” do plasmídeo pH79, “forward” (Fhc) e “reverse” (Rhc), desenhados a partir do sítio de *Bam*HI (Tabela 6).

Com os “primers” desenhados a partir do gene *cat*, foi obtida uma seqüência de 1.244pb. O “primer” Rcat não apresentou uma seqüência satisfatória, com diversos intervalos entre os nucleotídeos, dificultando a análise da seqüência. Por sua vez, o “primer” Fcat resultou em uma seqüência de aproximadamente 725 pb, onde 100 pb correspondem a seqüências de inserção (IS) do transposon mini-*Tn*10 e os 625 pb restantes ao cromossomo da *E. coli*. A partir da análise dessa seqüência, utilizando “cromossomo walking”, foi desenhado um novo “primer” denominado Fmcat (Tabela 6, Figura 20). Através do programa DNASTAR (Seqman), verificou-se que, com o primer Fmcat foi possível seqüenciar 519 pb, que formaram um “contig” com a seqüência de 625 pb totalizando, assim, 1.244pb nucleotídeos sequenciados, localizados no sentido “upstream” ao gene *cat*, permitindo assim localizar no clone pAZ2 o local de inserção do mini-*Tn*10.

Com os “primers” desenhados a partir do plasmídeo pH79, foi obtida uma seqüência de 899 pb. O “primer” Rhc resultou em uma seqüência de 442 pb correspondente apenas ao vetor pH79, onde não foi localizado o sítio de clonagem *Bam*HI. Já o “primer” Fhc resultou em uma seqüência de 457 pb, que apresentava o

sítio de clonagem *Bam*HI no nucleotídeo 106 e a seguir a seqüência do clone cosmídeo pAZ2.

O clone pAZ2 apresenta 2.624 pb seqüenciados, sendo 953 pb referentes ao gene *cat* e 1.701 pb referentes a 1.244 pb, seqüenciados com os “primers” Fcat e FMcat (Anexo 8.10.1) e 457 pb, seqüenciados com o “primer” Fhc (Anexo 8.10.2).

4.11. Análise da seqüência de 1.244 pb e da proteína deduzida

A análise dos 1.244 pb obtidos a partir do seqüenciamento do clone pAZ2 com os “primers” Fcat e Fmcat, foi realizada utilizando-se o programa BLAST.

O BLASTN identificou o gene *cat* nos 100 primeiros nucleotídeos, sendo possível, assim, localizar o sítio de inserção deste gene e a partir do nucleotídeo 102, foi identificada homologia de 97% com uma ORF presente em *E. coli* K12 MG1655, *E. coli* uropatogênica CFT073, *Shigella flexneri* 2a, outras *E. coli* e bactérias enteropatogênicas. Esta ORF, denominada *ygjV* codifica para uma proteína de membrana interna, uma permease com função hipotética.

De acordo com o contexto genômico analisado a partir da *E. coli* K12 MG1655, nas posições 3237.000 a 3241.000, a pesquisa no banco de dados através do BLASP identificou “downstream” a *ygjV* uma outra ORF transcrita na mesma direção, com homologia de 97% de identidade, com um sistema de transporte, que contém os genes altronato hidrolase (*uxaA*) e uronato isomerase (*uxaC*). A Figura 21 representa o mapa linear do fragmento de 1.244 pb do clone pAZ2, demonstrando a localização genética da proteína *ygjV*, das ORFs *uxaA* e *uxaC* bem como, o sítio de inserção do gene *cat*.

A análise da proteína foi realizada através do BLASTX. O peptídeo deduzido a partir da região de 1.244 bp, identificou do nucleotídeo 656 ao 108 uma proteína de 183 aminoácidos, com identidade de 91% com o COG (Clusters de Grupos Ortólogos de Proteínas)0477 pertencente à família das permeases facilitadoras e do nucleotídeo 1244 ao 741, 98% de identidade com altronato hidrolase de *Shigella flexneri*, apresentando apenas 503 aminoácidos da proteína de 495 aminoácidos (Figura 22).

4.12. Análise da seqüência de 899 pb e da proteína deduzida

A análise dos 899 pb obtidos a partir do seqüenciamento do clone pAZ2 com os “primers” Fhc e Rhc, foi realizada através do programa BLAST.

A partir da análise no BLASTN da seqüência de 442pb, obtida com o “primer” Rhc, observou-se homologia somente com o vetor pH79, não sendo possível a identificação do sítio de clonagem, *Bam*HI, sugerindo assim que o “primer” pode ter anelado em região diferente da esperada, sequenciando apenas o vetor de clonagem. Já com o “primer” Fhc, foi revelado na seqüência de 457 pb, que os 100 primeiros nucleotídeos possuem homologia com o vetor pH79 e a partir do nucleotídeo 106, foi identificada homologia de 94% com uma ORF, denominada *ygjU*, uma proteína de transporte.

Ainda de acordo com o contexto genômico encontrado em *E. coli* K12MG1655 (Figura 21), essa ORF está localizada “upstream” a *ygjV* e em direção oposta. A partir destes dados, pode ser sugerido, que o gene *cat* esteja inserido ao final das ORFs *ygjV* e *ygjU*, sem interrupção das mesmas.

A análise da seqüência nucleotídica, através do BLASTX identificou do nucleotídeo 108 ao 426 uma proteína de 414 aminoácidos. Essa proteína apresentou identidade de 90% do aminoácido 108 ao 326 e 69% do aminoácido 304 ao 426 com o COG3633, pertencente à família dos transportadores de sódio (Figura 23).

4.13. Prevalência da seqüência genética homóloga a proteína *ygjV* nas amostras de EAEC atípicas

A pesquisa da proteína *ygjV* nas outras 27 amostras de EAEC atípicas foi realizada através de PCR utilizando os “primers” Fmcat e RygjV (Tabela 6). O “primer” RygjV foi desenhado a partir da seqüência da proteína. Seqüências homólogas à proteína *ygjV*, presente na amostra RN153-1, foram detectadas em 17 (63%) das 27 amostras analisadas, sendo 12 (70%) isoladas de casos e 5 (50%) de controles. Todas as 4 amostras positivas para o ativador de transcrição *aggR*, dentre essas, a portadora da seqüência *aafA*, amplificaram a seqüência pesquisada para o gene *ygjV*.

4.14. Ensaios preliminares para caracterização fenotípica da adesina AA da amostra RN153-1

Iniciou-se uma série de ensaios preliminares para caracterizar a adesina AA na amostra RN153-1. Primeiramente, procurou-se verificar a presença de estruturas de superfície através de microscopia eletrônica de transmissão após coloração negativa. As observações de microscopia eletrônica realizadas com a amostra selvagem RN153-1 cultivada em caldo LB sem aeração revelaram a presença de estruturas fimbriais, com morfologia semelhante à fímbria tipo 1 (Figura 24A e 24B). Por outro lado, a análise do clone pVIII-F-1 revelou a existência de poucas fímbrias semelhantes às observadas anteriormente (Figura 24C e 24D).

Com o intuito de verificar a presença da fímbria do tipo 1 foi realizada uma reação de PCR utilizando um conjunto de “primers” que reconhece o gene *fimA*, que codifica a maior subunidade estrutural da fímbria do tipo 1. Ambas as amostras RN153-1 e pVIII-F-1 amplificaram o gene *fimA* (dados não mostrados).

Em seguida, pesquisou-se o perfil eletroforético de proteínas das amostras RN153-1, pVIII-F-1 e pVIII-F1::Tn10 após cultivo das mesmas em diferentes meios de cultura e aquecimento a 60°C. A eletroforese em gel de SDS-PAGE revelou apenas uma proteína de aproximadamente 25 KDa predominante somente nos extratos proteicos aquecidos do mutante pVIII-F-1::Tn10 cultivado em ágar LB (Figura 25).

Como não foi possível visualizar uma proteína bacteriana com potencial de adesina, pesquisou-se então a presença de proteínas de membrana externa, envolvidas na adesão AA. Esse estudo foi feito comparando-se o perfil eletroforético de proteínas de membrana externa da amostra RN153-1 ao de uma amostra de mesmo sorogrupo, mas não aderente. A amostra selecionada, *E. coli* 213-1 de sorogrupo O126 pertencia à bacterioteca da Prof. Dra. Isabel Scaletsky.

A análise dos componentes da preparação de membrana externa das duas amostras revelou uma proteína de aproximadamente 85 kDa presente na amostra RN153-1 e ausente na amostra 213-1 (Figura 26).

A proteína de 85 kDa foi purificada a partir de preparações de membrana externa da amostra RN153-1 cultivada em ágar LB. Foram obtidos cerca de 200 mg de proteína, sendo que esta fração foi concentrada, separada por SDS-PAGE e transferida para uma membrana de PVDF. A banda equivalente ao peso de 85 KDa foi localizada e submetida à determinação da seqüência de aminoácidos da região N-terminal.

A comparação da seqüência dos 19 aminoácidos realizada através do programa BLASTP indicou que ela apresentava uma identidade de 71% com a proteína flagelina de *E. coli* (Figura 27).

TABELA 4. Distribuição dos fatores de virulência plasmidial e cromossômico em 28 amostras de EAEC atípica, isoladas de crianças com e sem diarreia através de PCR ou sonda genética.

Amostras de EAEC	Sorogrupo ou sorotipo	Genes plasmidiais								Genes cromossômicos		
		<i>aggA</i>	<i>aafI</i>	<i>agg3</i>	<i>aggR</i>	<i>aap</i>	<i>astA</i>	<i>pet</i>	<i>shf</i>	<i>hET1/pi</i>	<i>irp2</i>	<i>hly</i>
Amostras												
RN731-5 ^a	O3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
3C385-5	O42	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
ISP53-1	O42	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3C319-3	O49:NM	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
RN779-4	O54	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
3C289-3 ^a	O86:NM	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
3C323-4	O89NM	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
VA701-1	O98	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
RN453-1	O117	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
RN741-5	O126:NM	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
RN153-1	O126	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
RN771-5	O162:NM	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
RN749-9	O162	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
HD137-10	ONT	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
RN767-7 ^a	ONT	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
RN751-9	ONT	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
3C373-4	ONT	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
VA691-2	ONT	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Controles												
3C358-1	O6:NM	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
3C378-3 ^a	O28	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
3C730-1	O49	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
RN406-5	O52	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
VA558-7	O66:NM	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
RN772-3	O89	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
RN502-1 ^a	O141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RN582-3	O174:NM	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
3C796-1	ONT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
3C798-4	ONT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a daaC positiva

^b NM, não movel NT, não tipavel.

TABELA 5. Distribuição dos fatores de virulência entre as amostras de EAEC atípica, isoladas de casos e controles.

Fator de Virulência	Nº (%) de isolados de EAEC atípica		
	Casos (n = 18)	Controles (n = 10)	Total (n = 28)
AAF/I	0	0	0
AAF/II	1 (5)	0	1 (3.6)
AAF/III	0	0	0
AggR	3 (17)	1 (10)	4 (14)
Aap	1 (5)	0	1 (3.6)
EAST1	15 (83)	2 (20) ^a	17 (61)
Pet	7 (39)	3 (30)	10 (36)
Shf	14 (78)	3 (30) ^b	17 (61)
ShET1/Pic	5 (28)	1 (10)	6 (21)
Irp2	8 (44)	2 (20)	10 (36)
Hly	2 (11)	1 (10)	3 (11)

^aSignificância de $P = 0.003$, foi determinado por χ^2 , teste.

^bSignificância de $P = 0.020$, foi determinado por χ^2 , teste.

TABELA 6. Seqüências nucleotídicas dos “primers” utilizados no seqüenciamento do clone pAZ2.

“Primers”	Seqüência (5'----3')
Fhc (Forward pH79)	AAGTGCCACCTGACGTCTAAGAA
Rhc (Reverse pH79)	CCACCATACCCACGCCGAAACAAG
Fcat (Forward do gene cloranfenicol)	TAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAAC
Rcat (Reverse do gene cloranfenicol)	CGAAGTGATCTTCCGTCACA
FMcat (Forward da seqüência de 725pb)	TACCAATCAGAAAGGCGA
RygjV(Reverse do gene ygjV)	GCGGGCTGCCATATGGTGCTGTT

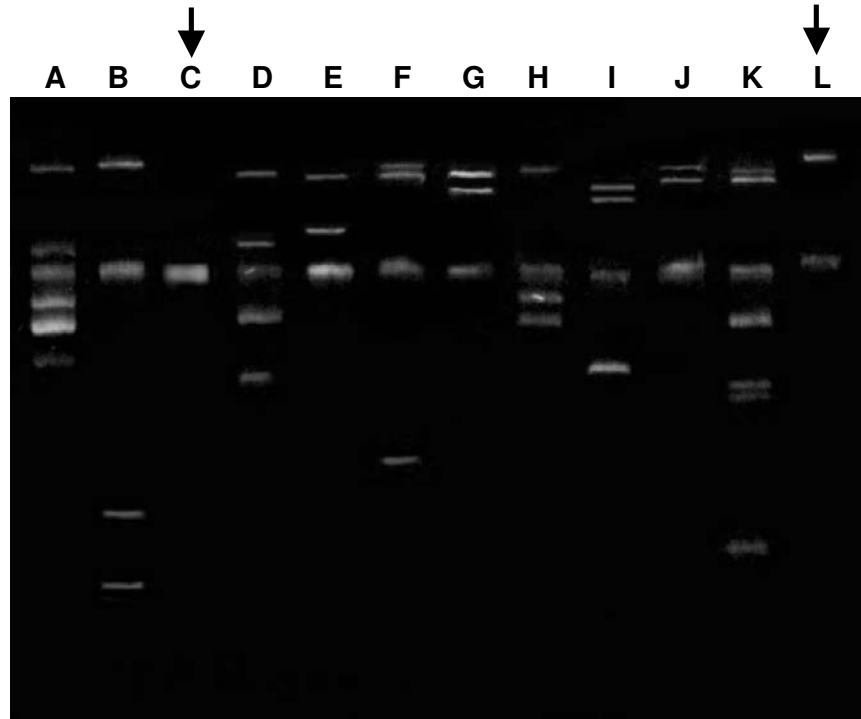


FIGURA 5. Perfil plasmidial de 12 amostras de EAEC atípica, isoladas de crianças com diarréia. Canaletas: A, SC385-5; B, SC319-3; C, RN153-1; D, SC323-4; E, RN779-4; F, MA701-1; G, RN741-5; H, RN771-5; I, RN749-9; J, HD137-10; K, RN751-9; L, MA691-2. As setas indicam as amostras RN153-1 e MA691-2.

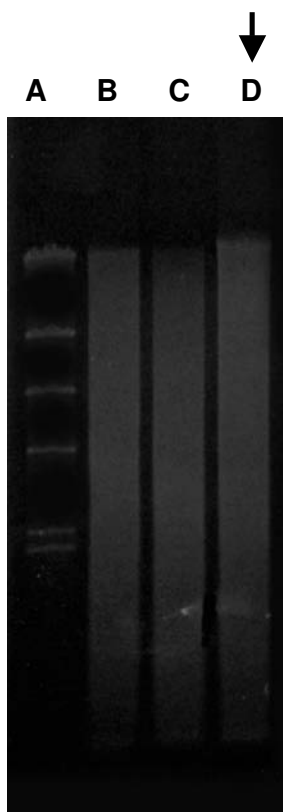


FIGURA 6. Gel de agarose 0,7% do DNA genômico da amostra RN153-1 digerido com a enzima de restrição *Sau3A* diluída na razão 1:10 utilizando diferentes tempos de digestão. Canaletas: A, Padrão de peso molecular λ /*Hind*III; B, 1 h; C, 1:30 h; D, 1:45 h.

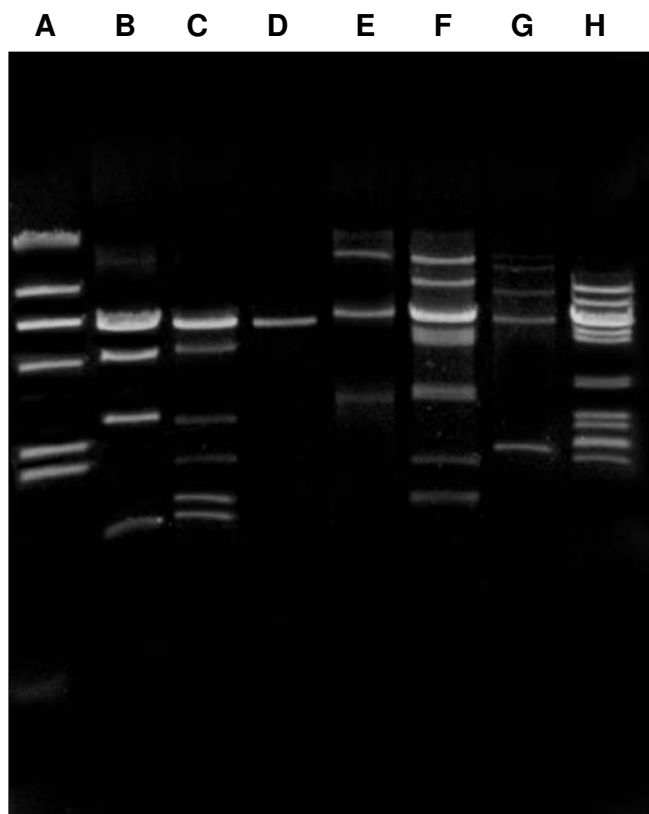


FIGURA 7. Gel de agarose 0,7% do DNA plasmidial de sete clones cosmídeo, obtidos na construção da genoteca com a amostra RN153-1, após digestão com a enzima de restrição *Bam*HI. Canaletas: A, Padrão de peso molecular λ /*Hind*III; B a H, sete diferentes clones cosmídeo.

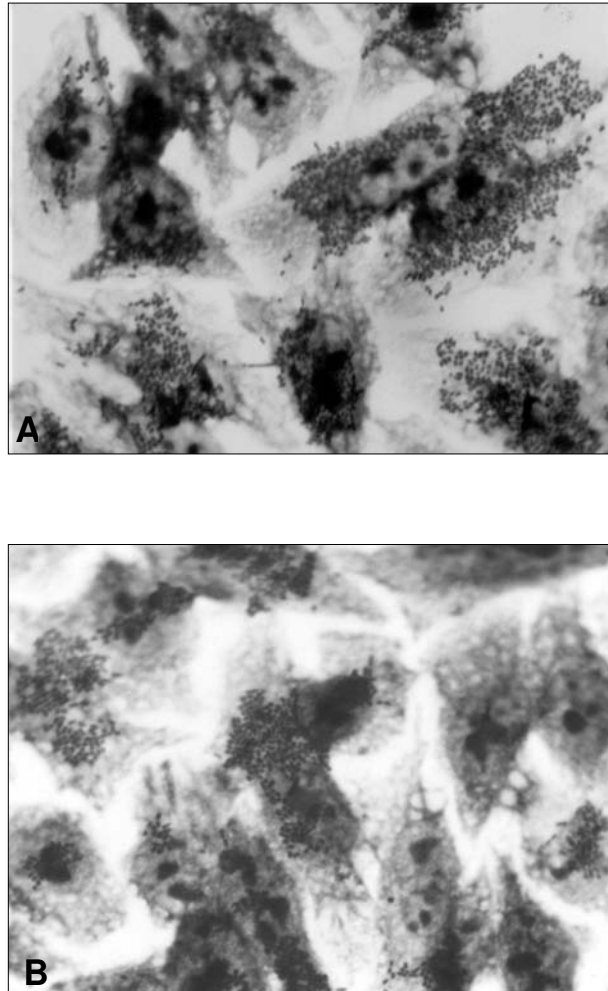


FIGURA 8. Padrões de adesão às células HEp-2 em ensaio de 3 h apresentados pela EAEC RN153-1 (**A**) e pelo clone cosmídeo pVIII-F-1 (**B**).

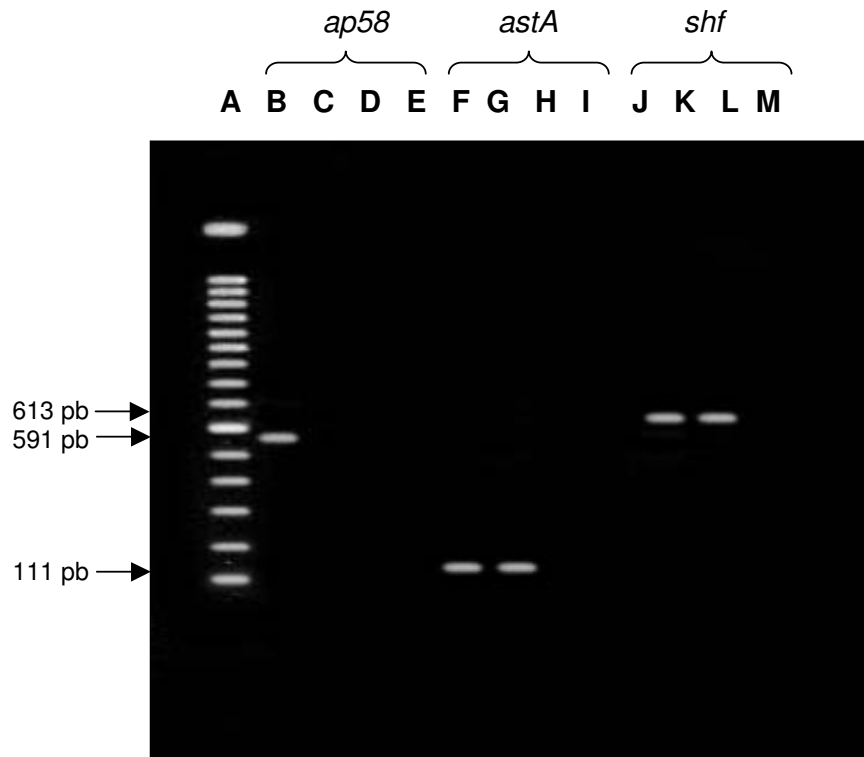


FIGURA 9. Gel de agarose 1%. PCR para amplificação dos genes *shf*, *astA* e *ap58*. Canaletas: A, padrão de peso molecular “100 pb DNA ladder”; B, EAEC 236 (controle positivo para *ap58*); F e J, EAEC 17-2 (controle positivo para *astA* e *shf*); C, G, K, RN153-1; D, H e L, clone pVIII-F-1; E, I, M, *E. coli* DH5 α .

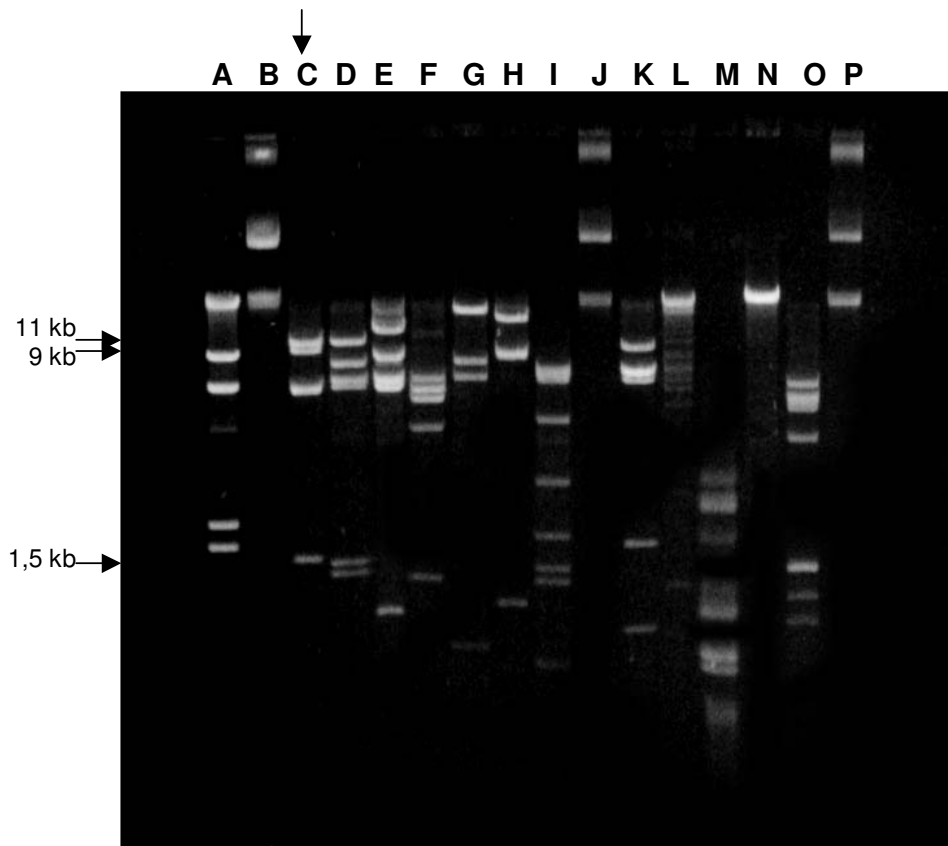


FIGURA 10. Gel de agarose a 0,7% do DNA plasmidial do clone cosmídeo pVIII-F-1, após digestão com diferentes enzimas de restrição. Canaletas: A, Padrão de peso molecular λ HindIII; B, clone pVIII-F-1 não digerido; C, *EcoRI*; D, *HindIII*; E, *Sall*; F, *PstI*; G, *ClaI*; H, *BamHI*; I, *EcoRV*; J, *XbaI*; K, *Scal*; L, *SphI*; M, *HincII*; N, *SmaI*; O, *BglII*; P, *PvuI*. As setas indicam os fragmentos *EcoRI* de 11, 9 e 1,5 kb.