

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL**

**KAMILA OLIVEIRA NUNES**

**ANÁLISE DO OPERON *perABC* EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli*  
ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICAS**

**SÃO PAULO  
2013**

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL**

**KAMILA OLIVEIRA NUNES**

**ANÁLISE DO OPERON *perABC* EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli*  
ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICAS**

**Monografia apresentada ao Programa de  
Aprimoramento Profissional/SES, elaborada  
no Instituto Butantan.**

**Área: Microbiologia e Parasitologia**

**Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior**

**SÃO PAULO**

**2013**

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Secretaria de Estado da Saúde (SES/SP).**

Nunes, Oliveira Kamila

Análise do operon *perabc* em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica atípicas/ Kamila Oliveira Nunes – São Paulo, 2013.

Trabalho de conclusão de aprimoramento profissional – Instituto Butantan  
São Paulo. Programa de Aprimoramento Profissional – Secretaria da Saúde do  
Estado de São Paulo.

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

1. *Escherichia coli* 2. aEPEC 3. plasmídio EAF 4. operon *perABC*

**KAMILA OLIVEIRA NUNES**

**ANÁLISE DO OPERON *perABC* EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli*  
ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICAS**

**Monografia apresentada ao Programa de  
Aprimoramento Profissional/SES, elaborada  
no Instituto Butantan.**

---

Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior  
Diretor Lab. Bacteriologia/Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Diva Denelle Spadacci Morena  
Coordenadora PAP

## RESUMO

Atualmente as *E. coli* enteropatogênica (EPEC) são subdivididas em típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC). A principal diferença entre os dois grupos é a presença do plasmídio EPEC *adherence factor* (pEAF) que ocorre somente nas amostras de tEPEC. Além de conter o operon que codifica a fímbria *bundle forming pillus* (BFP), o plasmídio EAF possui o operon *plasmid encoded regulator* (*per*), constituído pelos genes *perA*, *perB* e *perC*. Esse operon codifica proteínas que regulam a expressão do operon BFP e da região LEE, ou *locus of enterocyte effacement*. Embora o plasmídio EAF não esteja presente em amostras de aEPEC, alguns relatos da literatura descrevem amostras que apresentam o gene *perA*, mas que não hibridizam com o fragmento sonda EAF (EAF-/perA+). Com base nesses relatos o objetivo deste estudo foi avaliar a presença do operon *perABC* em 72 amostras de aEPEC. Os genes *perA*, *perB* e *perC* foram detectados pela técnica de PCR. Apenas 7 (9,7%) amostras foram positivas para os três genes do operon, sendo estas analisadas quanto a outras características do plasmídio EAF. O fragmento sonda EAF não foi encontrado em nenhuma das amostras e em três delas foi detectado o gene *bfpA*. Para verificar a integridade do operon foi realizado o teste de *restriction fragment length profile* – PCR com a enzima *SspI*, com o qual foi possível detectar a existência de três padrões de restrição diferentes, sendo um deles inédito na literatura. A amostra que apresentou este novo padrão de restrição para *perA* (BA4095) teve seu amplicon sequenciado e com isso foi possível confirmar a presença de códons de parada de transcrição, que inativam o operon. Esses dados indicam que algumas aEPEC podem albergar o operon *perABC* não funcional sem expressar a fímbria BFP e sem carrear o fragmento sonda EAF, sugerindo que o pEAF não está íntegro. Portanto, verificar a expressão de BFP é mais importante do que a detecção de marcadores genéticos do pEAF (*perA*, *bfp* ou EAF) na classificação de EPEC em típica ou atípica.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, aEPEC, plasmídio EAF, operon *perABC*

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	8
3. Materiais e Métodos.....	9
3.1 Amostras.....	9
3.2 Meios de cultura.....	9
3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	9
3.3.1 PCR.....	9
3.3.2 Análise da PCR.....	11
3.4 Purificação de DNA.....	11
3.5 Sequenciamento.....	11
3.6 Extração de plasmídeos e análise do perfil plasmidial.....	12
3.7 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) -PCR.....	13
4. Resultados.....	14
4.1 Detecção dos genes do operon <i>perABC</i> .....	14
4.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) -PCR.....	15
4.3 Sequenciamento do gene <i>perA</i> da amostra BA4095.....	16
4.4 Extração Plasmidial.....	20
5. Discussão.....	23
6. Conclusões.....	26
7. Referências Bibliográficas.....	27
Anexos.....	31

## 1. Introdução

A diarreia é um dos maiores problemas mundiais de saúde pública, e causa anualmente a morte de milhões de crianças até cinco anos, principalmente em países em desenvolvimento. Este resultado se dá principalmente pelo fato destes países (concentrados principalmente no continente Africano e sudeste da Ásia) possuírem uma ampla população de crianças abaixo de cinco anos e, também, por conta das condições epidemiológicas e socioeconômicas ali encontradas. (BLACK et al., 2010).

Repetidas crises diarreicas em crianças contribuem significativamente para deficiências de crescimento e comprometem parte do condicionamento físico, cognição e escolaridade. Estima-se que diarreias recorrentes nos primeiros dois anos de idade podem contribuir com a perda de 10 pontos no quociente de inteligência (Q.I.) e um ano de escolaridade até os nove anos de idade (PETRI et al., 2008).

A espécie *Escherichia coli* é o agente infeccioso bacteriano mais frequente nas formas endêmicas de diarreia infantil no mundo inteiro (WHO, 2002), e normalmente coloniza o trato gastrointestinal de crianças poucas horas após o nascimento, coexistindo em mútuo benefício e raramente causando doenças por décadas, exceto em imunocomprometidos ou quando a barreira gastrointestinal normal é rompida (revisado em KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

Existe uma grande diversidade patogênica de *E. coli*, compreendendo pelo menos seis categorias de amostras que causam infecção intestinal por diferentes mecanismos e outras especificamente associadas a infecções urinárias, meningites e outras infecções extraintestinais. As combinações de fatores de virulência de maior sucesso persistem e se tornam “patótipos específicos”, sendo estes patótipos identificados e classificados de acordo com suas características de virulência, interações com células epiteliais *in vitro* e manifestações clínicas. Os patótipos descritos para infecções intestinais são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC) (revisado em KAPER, NATARO e MOBLEY 2004).



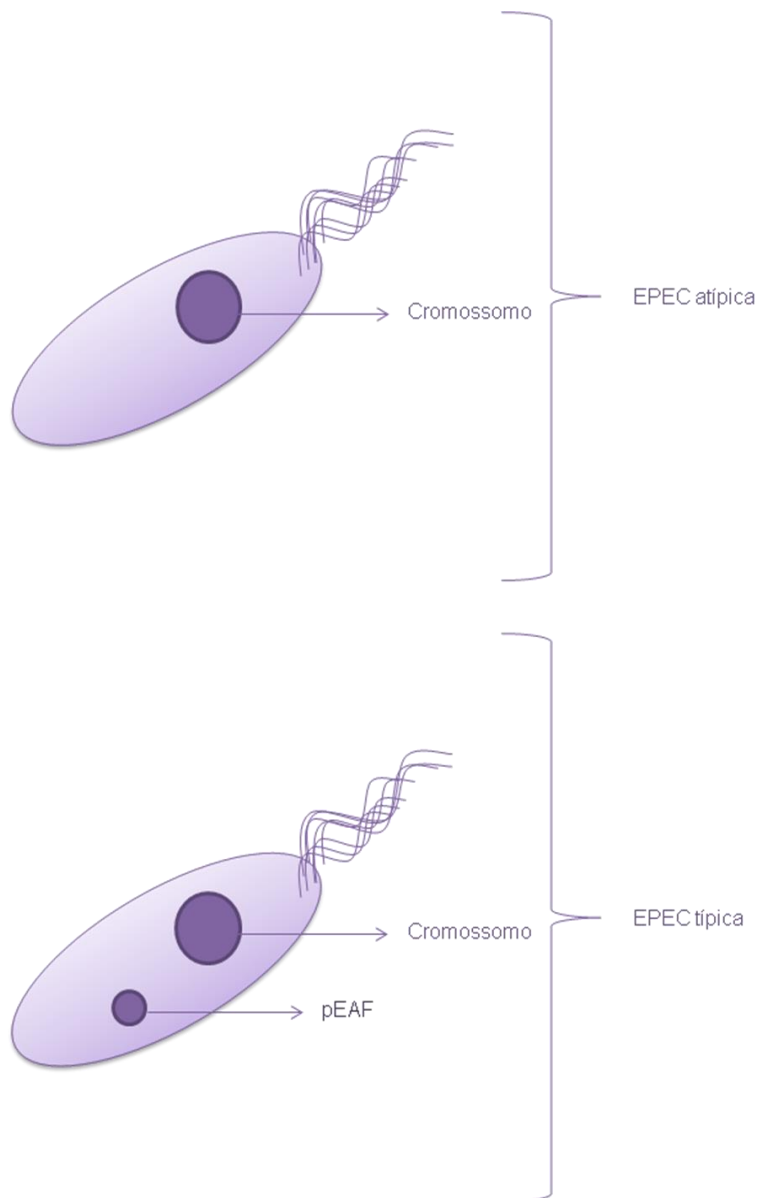
*Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é um importante agente etiológico de diarreia infantil em muitos países por conta de sua alta prevalência na comunidade e em ambientes hospitalares (revisado em OCHOA e CONTRERAS, 2011).

O termo EPEC foi criado para diferenciar os sorogrupos de *E. coli* associados a diarreia, os distinguindo dos sorogrupos comensais ou sorogrupos bacterianos encontrados em pacientes com infecções extra-intestinais (NETER et al., 1955).

Por conta de sua grande heterogeneidade genética essa categoria de *Escherichia coli* foi subdividida em EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC). Ambas as categorias são desprovidas dos genes que codificam a toxina de Shiga (Stx) e são capazes de produzir a lesão *attaching-effacing* (lesão A/E). Tal lesão é codificada na ilha de patogenicidade LEE e causa o apagamento das microvilosidades intestinais, forte adesão entre célula e bactéria e a formação de um “pedestal” sob a bactéria por conta do acúmulo de actina da célula eucariótica.

Lesões do tipo A/E podem ser examinadas *in vitro* pelo ensaio *fluorescent actin staining* (FAS) (HERNANDES et al., 2009). Como dito anteriormente, os genes necessários para o estabelecimento da lesão A/E estão localizados na ilha de patogenicidade denominada LEE. Esta ilha de 35 kb codifica componentes estruturais do sistema de secreção do tipo III (SSTIII), reguladores, translocadores, chaperonas e moléculas efetoras que alteram o processo celular do enterócito. LEE codifica uma proteína trans-membrana de 94 kDa denominada intimina, que medeia a íntima adesão da EPEC ao enterócito. Além disso, intimina também estimula resposta imune do hospedeiro e a hiperplasia intestinal (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; HERNANDES et al., 2009).

A principal diferença entre os dois grupos (típica e atípica) está na presença do plasmídeo EAF (pEAF-EPEC *Adherence Factor*), presente somente nas amostras de EPEC típicas (KAPER, 1996), conforme esquematizado a seguir.



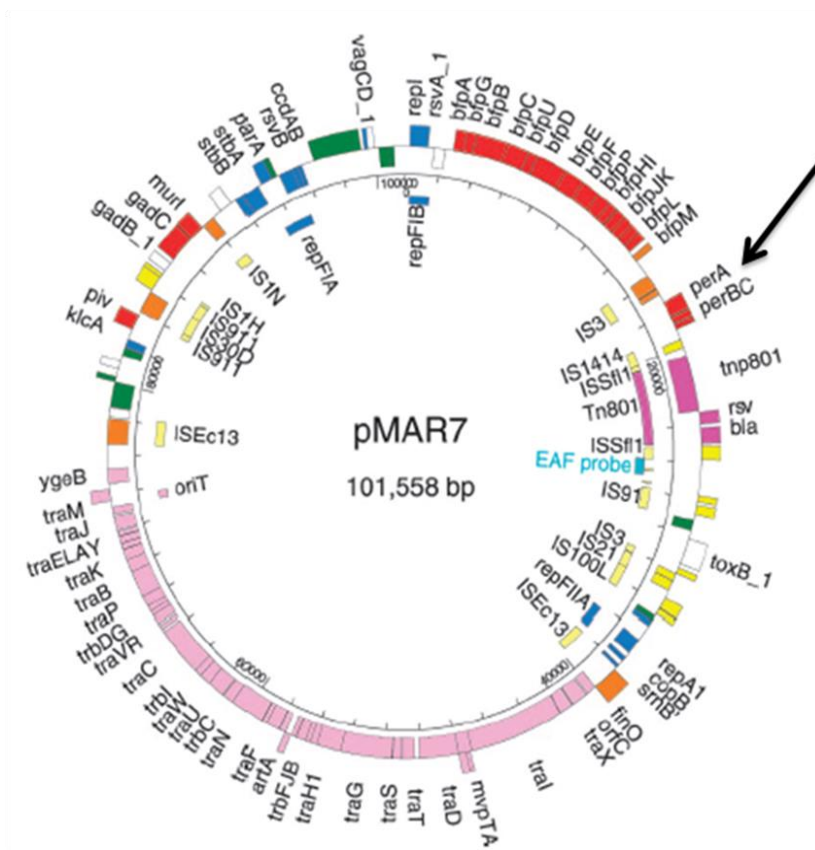
**Figura 1-** Representação esquemática das diferenças entre EPEC típica e atípica. As amostras de tEPEC possuem o plasmídeo EAF enquanto as aEPEC não apresentam este plasmídeo.

As amostras de tEPEC caracterizam-se pelo padrão de adesão localizada (AL) na superfície de células HeLa e HEp-2, apresentando-se como microcolônias compactas aderidas às células após três horas de contato. As amostras de aEPEC apresentam um padrão de aderência semelhante a tEPEC, porém com microcolônias mais frouxas, denominado adesão localizada *like* (AL-like ou LAL), o qual pode ser observado após seis horas de contato com a célula epitelial

(SCALETSKY et al. 1984; SCALETSKY et al., 1999; NATARO et al., 1987). Entretanto, algumas amostras de *E. coli*, caracterizadas como aEPEC, podem expressar padrões de adesão distintos do LAL, como o padrão difuso (DA) ou agregativo (AA) e até mesmo o padrão localizado (LA) com 6 horas de contato entre a célula e a bactéria (HERNANDES et al., 2009; ABE et al., 2009).

Em 1987, a Organização Mundial da Saúde reconheceu 12 sorogrupos conhecidos como sorogrupos clássicos de EPEC, que são usados em diagnóstico: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (WHO, 1987). Entretanto, estudos epidemiológicos mais recentes mostram que grande parte das amostras de aEPEC estão inseridas em sorogrupos não-clássicos ou são classificadas como O não tipáveis, o que define as aEPEC como um grupo altamente diverso. Ensaio genéticos que incluem PCR e multiplex PCR para detectar *bfpA* (que codifica a maior subunidade de pilina da fímbria BFP), *eae* (adesina intimina), fragmento sonda EAF e o gene *perA* também são usados no diagnóstico, identificação e classificação dessas amostras (HERNANDES et al., 2009).

O plasmídio EAF é encontrado somente em tEPEC e pode apresentar de 50 a 80 MDa (GOMÉZ-DUARTE e KAPER, 1995). Conforme ilustrado na figura 2, este plasmídio apresenta uma região críptica nomeada sonda EAF, usada para diagnóstico de tEPEC (KAPER et al., 2004; NATARO e KAPER 1998), e dois importantes operons, o regulador codificado pelo plasmídio (plasmid encoded regulator-PER) e o bundle forming pilus (BFP), que codifica a fímbria BFP (BRINKLEY et al., 2006). Operon é um conjunto de genes estruturais em uma bactéria juntamente com um promotor comum e outras sequências (tais como um operador) que controlam a transcrição de genes estruturais (PIERCE, 2004). O operon *perABC* possui o conteúdo G+C menor do que a maioria das outras partes do plasmídio EAF, e nas amostras controle E2348/69 e B171-8 é flanqueado por sequências de inserção, o que pode sugerir mobilidade nesses genes (GOMÉZ-DUARTE e KAPER, 1995; TOBE et al., 1999).



**Figura 2-** Representação esquemática do plasmídio pMAR7 (pEAF); nela podemos observar o operon *perABC*, entre as sequências de inserção, indicado por uma flecha. Adaptado de BRINKLEY et al. (2006).

O operon *per* consiste de três genes: *perA*, *perB* e *perC*. O gene *perA* codifica uma proteína (PerA) que pertence a família *AraC* de ativadores transcricionais e é responsável por ativar BFP e o operon *per* (TOBE et al., 1996; MARTINEZ-LAGUNA et al., 1999). Os ativadores transcricionais da família *Ara-C* regulam diversos sistemas genéticos, incluindo catabolismo do açúcar, resposta ao estresse e virulência (MARTIN e ROSNER, 2001). Já foi demonstrado que Per ativa genes dentro e fora de LEE por via de LEE-encoded regulator (*ler*), o operon *bfp* e um gene cromossomal envolvido na formação de microcolônias, denominado *trcA*. (MELLIES et al., 1999; TOBE et al., 1996; TOBE et al., 1999). O gene *perB* codifica uma proteína que aumenta a atividade de PerA por um mecanismo ainda desconhecido (TOBE et al., 1996; GÓMEZ-DUARTE e KAPER, 1995). O gene *perC*, além de aumentar a atividade de *perA*, pode induzir independentemente a expressão de *ler* e, conseqüentemente, dos genes de LEE em EPEC (PUENTE et

al., 2011). A figura 3 apresenta um esquema da ativação de LEE e *bfp* via Per.

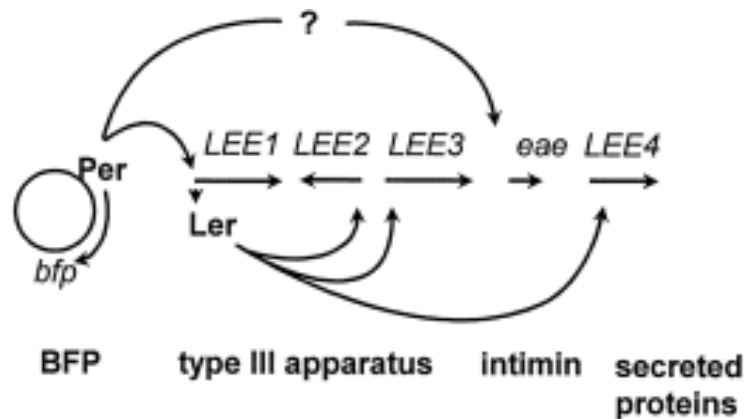


Figura 3- Representação esquemática da ativação dos genes de LEE e *bfp* via proteínas Per. Retirado de Mellies et al. (1999).

Mellies et al. (1999) afirmaram que Per ativa a expressão de 4 operons policistrônicos de LEE em EPEC, confirmando que Per é um regulador global. Neste mesmo estudo foi mostrado que PerA interage diretamente com os promotores de *bfp* e *eae*.

O peso molecular predito para os polipeptídios codificados na região *per* são de 24 kDa para PerA, 14,8 kDa para PerB e 10,5 kDa para PerC, sendo que *perA* possui 825 pb, *perB* 390 pb e *perC* 270 pb. Os produtos gerados a partir de *perABC* regulam positivamente a expressão de *eae*, e aumentam a aderência a células HEp-2 em teste de adesão in vitro (GÓMES-DUARTE e KAPER, 1995).

Okeke et al. (2001) demonstraram que genes de *per* em amostras de EPEC típicas possuem pouca variação em sua seqüência genética em comparação com a seqüência genética da amostra controle E2348/69, encontrando de 94 a 99% de identidade entre as amostras. As amostras estudadas demonstraram mutações de mudança de fase de leitura somente na seqüência do gene *perA*, as quais podem ser detectadas por PCR-RFLP utilizando a enzima *Ssp-I*. Estas variações geram um códon de parada de leitura, e por conta disso os demais genes do operon, *perB* e *perC*, também não são traduzidos.

Alguns estudos anteriores relataram a presença do gene *perA* em amostras de EPEC atípicas (VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004;

CONTRERAS et al., 2010), mas nenhum demonstrou a funcionalidade do operon *perABC* nestas amostras.

Vieira et al. (2001) conduziram um estudo no qual uma coleção de 59 amostras de aEPEC foram caracterizadas fenotípica e genotipicamente. Estas amostras foram isoladas durante um estudo epidemiológico sobre a diarreia aguda em crianças. Destas amostras, três (5,1%) foram positivas para o gene *perA* em ensaios de hibridização por *colony blot*.

Em outro estudo conduzido por Dulger et al. (2003) foram analisadas 65 amostras de aEPEC, também isoladas de crianças com diarreia, das quais 33 (51%) foram reativas com a sonda *perA*.

Em outros relatos o gene *perA* foi detectado em frequências entre 7 e 18% (GOMES et al., 2004; CONTRERAS et al., 2010). Entretanto, conforme mencionado anteriormente, em nenhum desses trabalhos houve a pesquisa de todos os genes do operon *per*, nem de sua funcionalidade.

Por conta desses resultados surgiu a necessidade de analisar a presença do operon *perABC* e a integridade de *perA* em amostras de aEPEC.

## **2. Objetivo**

Determinar a presença do operon *perABC* e a integridade do gene *perA* em 72 amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas atípicas.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1 Amostras**

As 72 amostras de aEPEC selecionadas para este estudo fazem parte da coleção de amostras do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan e foram previamente isoladas de um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda, realizado na cidade de Salvador-BA (BUERIS et al., 2007). Essas amostras foram previamente classificadas de acordo com a adesão a células epiteliais HEP-2 e expressão de fímbria BFP (Abe et al, 2009).

A amostra protótipo de tEPEC E2348/69 (LEVINE et al., 1978) foi utilizada como controle positivo para os experimentos de reação de PCR para os genes *perABC*, extração plasmidial e RFLP-PCR.

A amostra protótipo DH5 $\alpha$  (SAMBROOK et al. 1989) foi utilizada como controle negativo para os experimentos de reação de PCR para os genes *perABC*.

Os isolados utilizados neste estudo estão preservados a - 80°C em caldo Luria-Bertani (LB) acrescido de 15% de glicerol (v/v).

#### **3.2 Meios de cultura**

Os meios de cultura e soluções utilizados para cultivo das amostras foram preparados de acordo com Sambrook et al. (1989).

#### **3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

##### **3.3.1 PCR**

Para cada PCR foram utilizados 40 pmol de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), os quais estão descritos na tabela 1, 1 U de Taq DNA-Polimerase (Invitrogen Corporation, EUA), 1,5  $\mu$ M de MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de mistura de dNTPs (200  $\mu$ M de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen Corporation, EUA), 5  $\mu$ l do tampão de reação de PCR 10x concentrado (Invitrogen Corporation, EUA) e 1 $\mu$ l do lisado bacteriano.

Como DNA molde para as reações de PCR foi utilizado 1  $\mu$ l de lisado bacteriano ou 3  $\mu$ l de DNA genômico.

O lisado bacteriano foi obtido a partir de colônias isoladas de placas de ágar LB, as quais foram transferidas para tubos de polipropileno estéreis contendo 500  $\mu$ l



de água MilliQ estéril, sendo estes ressuspensos e submetidos à fervura por 10 min e choque térmico em gelo por 5 min. Após este procedimento os lisados bacterianos foram preservados a -20°C.

O DNA genômico foi obtido com auxílio do kit comercial illustra<sup>tm</sup> bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare®, USA), segundo recomendações do fabricante, e após a extração o DNA foi preservado a -20°C.

Os ciclos de amplificação e o tamanho dos fragmentos amplificados (amplicons) estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1- Iniciadores de *perABC***

Iniciadores	Sequência	Ciclo de amplificação	Amplicon (pb)	Referência
<i>perA</i>	(F)AACAAGAGGAGAATTTAGCG (R)CTTGTGTAATAGAATAATCGC	30x: 1' 94°C; 1' 56°C; 1' 72°C	770	Rocha et al., 2011
<i>perB</i>	(F)ATGGATGTATGAATGTATTG (R)CTATGGTGCTCTTTTTGATT	30x: 1' 94°C; 1' 55°C; 1' 72°C	350	Este estudo
<i>perC</i>	(F)ATGGAAATAAGAGATAAAAAG (R)TTAATTTTCCTTGAGTTTCT	30x: 1' 94°C; 1' 55°C; 1' 72°C	270	Este estudo

Para o sequenciamento do gene *perA* da amostra BA4095 a PCR foi realizada com a enzima Taq polimerase high fidelity.

Para cada reação de PCR High Fidelity foi utilizado 40 pmol de cada um dos iniciadores *perA* (F) e (R) (Tabela 1), 1 U de Platinum® Taq DNA-Polymerase (Invitrogen Corporation, EUA), 0,75 µM de MgSO<sub>4</sub>, 200 µM de mistura de dNTPs (200 µM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen Corporation, EUA), 5µl tampão de reação de PCR High Fidelity 10x concentrado (Invitrogen Corporation, EUA) e 1µl do lisado bacteriano como DNA molde. O ciclo de amplificação foi o seguinte: 35x: 1'

94°C; 1' 56°C; 1' 72°C.

### **3.3.2 Análise da PCR**

Após os ciclos de amplificação, 5 µl das reações adicionadas de 2 µl de tampão de amostra para DNA 6X (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%) foram analisadas em gel de agarose de 0,8 a 1% corados com Gelred®.

Os géis foram preparados por fusão da agarose (Invitrogen, EUA) em tampão TAE 1X (tris-acetato 40 mM; ácido etilenodiaminotetracético 2 mM) na concentração final de 1% acrescido de 2,5 µl do corante Gelred® (Molecular Probes Inc., EUA). Como marcador de peso molecular foram utilizados os marcadores *1Kb DNA ladder* ou *100 bp DNA ladder* (Invitrogen, EUA). As corridas eletroforéticas foram realizadas sob corrente constante de 80 V em tampão TAE 1X e em seguida foram observadas em transiluminador de luz ultravioleta. As imagens foram registradas e salvas através do sistema de captação de imagem Alphamager 2200 (Alpha Innotech, EUA).

### **3.4 Purificação de DNA**

A purificação de DNA para sequenciamento foi realizada com auxílio do *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare®, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Após purificação o DNA foi mantido a -20°C.

### **3.5 Sequenciamento**

O sequenciamento do gene *perA* da amostra BA4095 foi realizado a partir do DNA obtido da reação de PCR para este gene. Após análise em gel de agarose o produto amplificado foi purificado utilizando o *ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare®, EUA) e sua concentração foi determinada por meio de corrida eletroforética comparando-se a banda obtida com o padrão comercial *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, EUA). Após quantificação o DNA foi submetido ao sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da universidade de São Paulo – USP.

As sequências foram obtidas utilizando o sequenciador automático

*MegaBACE 1000* (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) e as reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante.

Para análise e alinhamento do gene sequenciado foi utilizado o programa *SeqMan™ 4.05* (Expert Analysis Software – DNASTar, Inc para PC, Madison, WI, EUA). As sequências obtidas foram comparadas com a sequência da amostra controle E2348/69 listada no *EMBL/GenBank* (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>)

### **3.6 Extração de plasmídeos e análise do perfil plasmidial**

Para extração de plasmídeos foi utilizada a metodologia descrita por Santos (2009). Nesta metodologia o DNA plasmidial das amostras é obtido em pequena escala utilizando o kit Promega – Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation – EUA), com algumas modificações.

Neste protocolo 5 mL de meio LB foram inoculados com 50 µl de cultura bacteriana recente e incubado a 37°C por 12 h sem agitação. Após a incubação da amostra todo o volume da cultura foi processado em três etapas sucessivas. Na primeira, o volume da cultura foi transferido para um tubo de 2 mL e submetido a centrifugação durante 5 min a 14.000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e o sedimento bacteriano foi utilizado para a extração plasmidial.

Após a adição da solução neutralizante contida no kit, o tubo contendo a suspensão coloidal de DNA cromossômico, debris celulares e DNA plasmidial foi incubado em gelo durante 18 h e em seguida centrifugado a 14.000 rpm por 30 min. O sobrenadante (~800 µl) foi transferido para um tubo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 0,7 volumes de álcool isopropílico e a mistura foi homogeneizada por inversão durante 30 seg. Nesta etapa os tubos foram mantidos a -20°C durante 30 min e centrifugados a 14.000 rpm por 20 min à 4°C. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se 1ml de álcool etílico a 70% e efetuou-se uma nova centrifugação a 14.000 rpm, a 4°C, por 15 min. O sobrenadante foi descartado e os tubos contendo o DNA plasmidial foram mantidos em capela de fluxo laminar durante cerca de 20 min para a evaporação de resíduo de álcool. Após a evaporação o DNA plasmidial foi homogeneizado, sem agitação, em 50 µl de água MilliQ e foi mantido a -20°C até o momento do uso.

Para análise do perfil plasmidial, as amostras obtidas foram acrescidas de 5 µl de tampão de corrida e então foram submetidas a eletroforese em gel de agarose

conforme descrição no item 3.3.2.

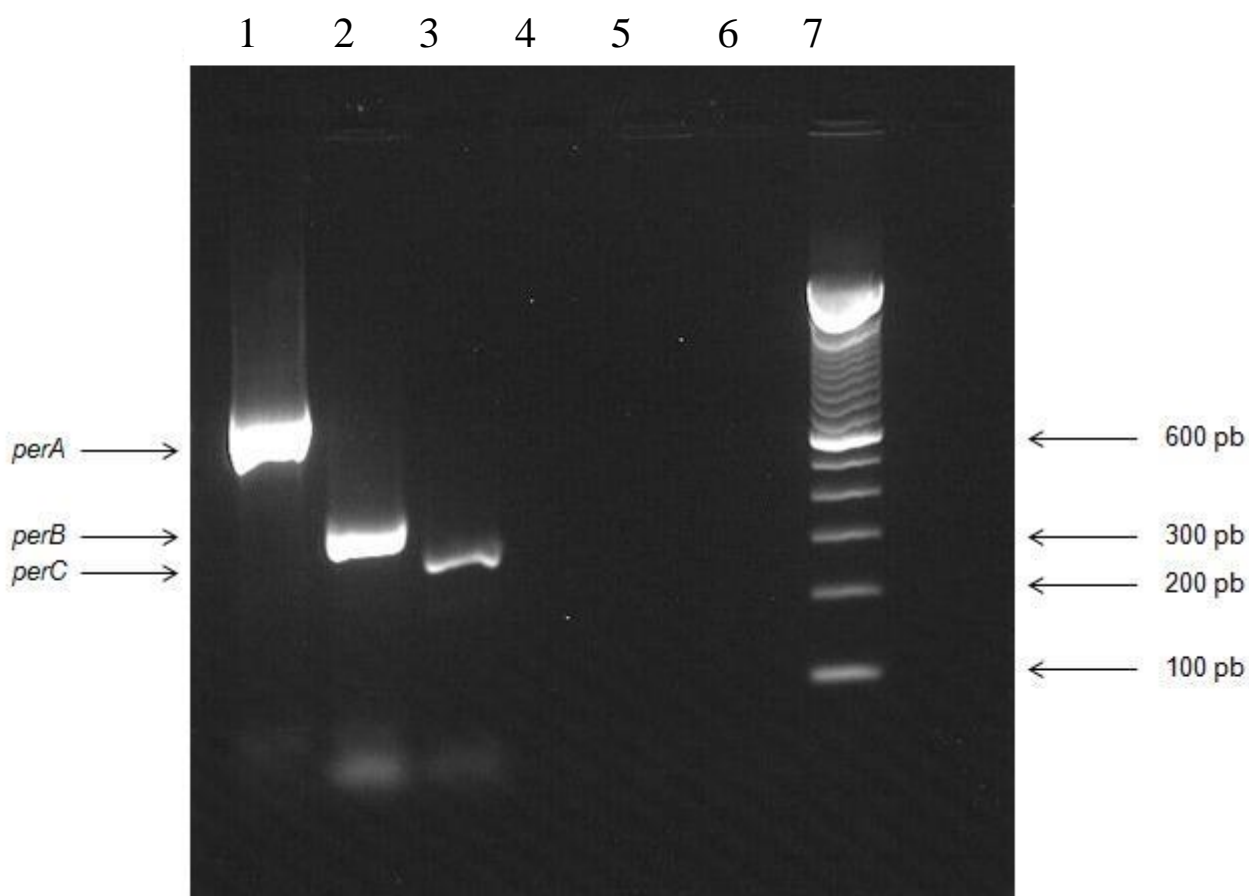
### **3.7 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)-PCR**

O ensaio de RFLP-PCR com a enzima *Sspl* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Okeke et al. (2001). A região compreendendo o gene *perA* foi amplificada por PRC com iniciadores descritos na Tabela 1. O produto resultante da reação foi digerido a 37°C por 90 min pela enzima *Sspl* (Promega). Os fragmentos foram distinguidos através de eletroforese em gel de agarose a 2% conforme descrito no item 3.3.2, utilizando como marcadores *1Kb DNA ladder* e *100 bp DNA ladder* (Invitrogen, EUA).

## 4. Resultados

### 4.1. Detecção dos genes do operon *perABC*

As 72 amostras deste estudo foram pesquisadas por PCR quanto à presença dos genes *perABC*. Inicialmente os iniciadores foram testados e sua funcionalidade foi confirmada à partir da reação com a amostra controle de tEPEC E2348/69. Conforme mostrado na figura 4 houve a amplificação dos produtos esperados nas PCRs para *perA* (770pb), *perB* (350pb) e *perC* (270pb).



**Figura 4-** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com Gelred® confirmando a funcionalidade dos iniciadores para os genes de *perABC* utilizando as amostras controle E2348/69 (positivo) e DH5 $\alpha$  (negativo).

Canaletas: (1) Amplicon *perA*; (2) Amplicon *perB*; (3) Amplicon *perC*; (4) Controle negativo *perA*; (5) Controle negativo *perB*; (6) Controle negativo *perC*; (7) 100 pb *ladder*.

Em seguida as 72 amostras de aEPEC foram avaliadas quanto à presença desses genes. Sete amostras (9.7%) apresentaram os genes *perA*, *perB* e *perC*, 5 amostras (6.9%) apresentaram os genes *perB* e *perC* e 2 amostras apresentaram somente o gene *perB* (2,8%), totalizando 14 amostras (19.4%) positivas para quaisquer genes do operon. Esses resultados estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 2-** Prevalência dos genes *perA*, *perB* e *perC* em 72 amostras de aEPEC.

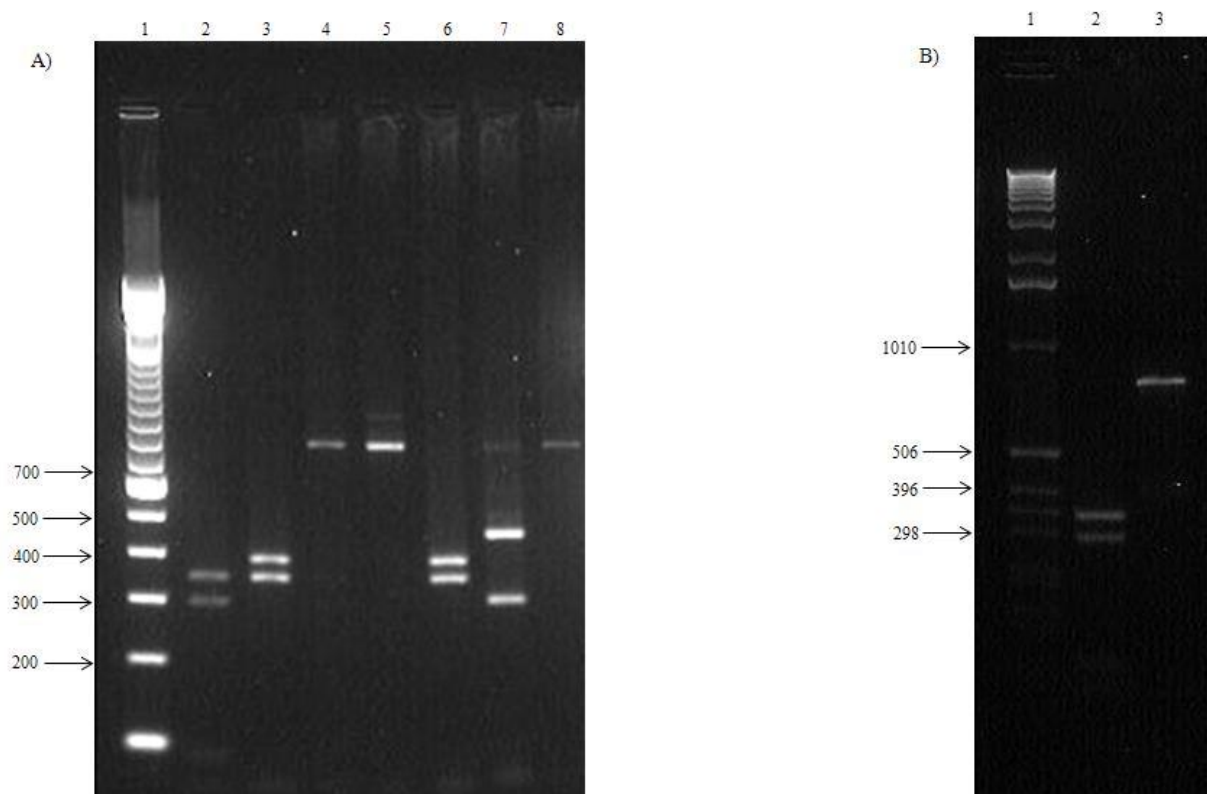
<b>Genes</b>	<b>Amostras Positivas (%)</b>
<i>perABC</i>	7 (9,7%)
<i>perBC</i>	5 (6,9%)
<i>perB</i>	2 (2,8%)
<b>TOTAL</b>	<b>14 (19,4%)</b>

#### 4.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) PCR

Para as amostras que apresentaram o gene *perA* foi realizado o teste proposto por Okeke et al. (2001), onde o gene *perA* é digerido pela enzima *SspI* em regiões específicas. Nenhuma das 7 amostras apresentou o padrão de restrição da amostra controle E2348/69, como apresentado na figura 5. No trabalho apresentado por Okeke et al. (2001) foram descritos três perfis de restrição. O primeiro perfil descrito apresenta dois fragmentos, um de 340 e outro de 282 pb, o qual sugere o gene *perA* íntegro e funcional, como apresentado pela amostra E2348/69. Os perfis de restrição que sugerem mutação em *perA* geraram dois perfis distintos, um com

um único fragmento de 774 pb e outro com dois fragmentos, sendo um de 371 pb e outro com 335pb.

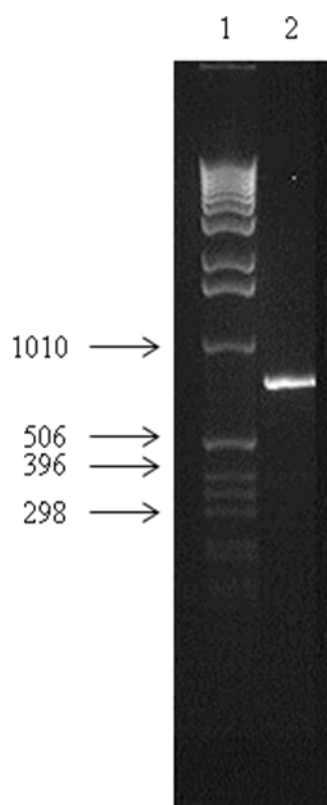
Como mostrado na figura 5, as amostras pesquisadas no presente estudo apresentaram perfis polimórficos indicando sequências de *perA* não funcionais. Das sete amostras utilizadas neste teste, seis apresentaram os perfis de restrição de genes não funcionais descritos por Okeke et al. (2001) em amostras de tEPEC. Interessantemente uma amostra (BA4095) apresentou um novo e desconhecido padrão de restrição contendo dois fragmentos, um de 448 pb e outro de 326 pb.



**Figura 5.** Gel de agarose da PCR-RFLP utilizando a enzima *SspI* corado com Gelred®. **(A)** Canaletas: (1) 100 pb ladder (Invitrogen, USA). (2) E2348/69, (3) BA558, (4) BA1444, (5) BA2034, (6) BA2482, (7) BA4095, (8) BA4192. **(B)** Canaletas: (1) 1 kb ladder (Invitrogen, USA), (2) E2348/69, (3) BA3157.

#### 4.3 Sequenciamento do gene *perA* da amostra BA4095

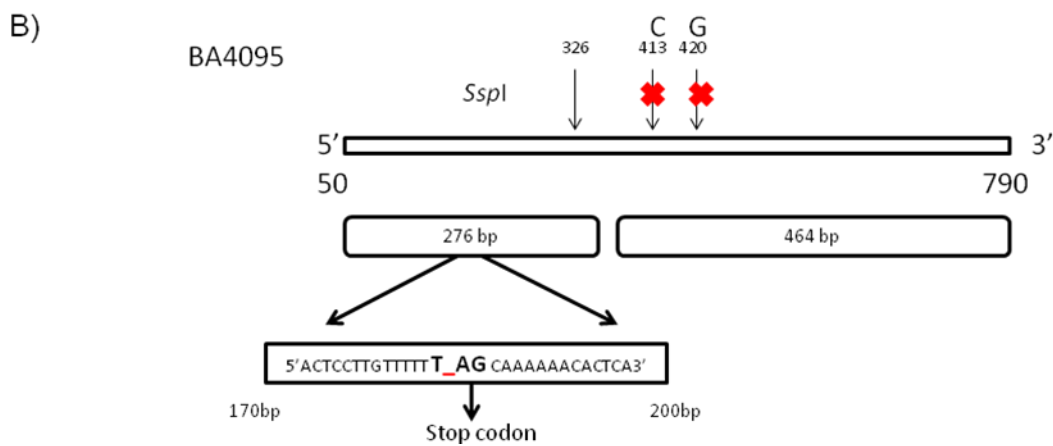
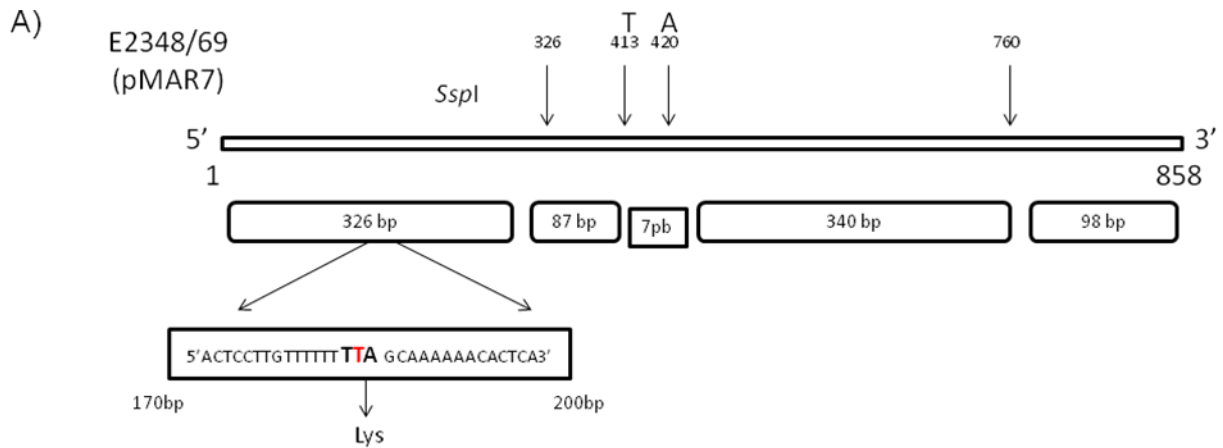
A amostra BA4095 foi submetida a PCR High Fidelity para o gene *perA* e o produto da reação foi purificado para posterior sequenciamento do gene. A figura 6 mostra a purificação da PCR High Fidelity em gel de agarose.



**Figura 6.** Gel de agarose a 1% corado com GelRed® da reação de PCR High Fidelity para o gene *perA* da amostra BA4095 purificado para sequenciamento. Canaleta 1: 1kb ladder; Canaleta 2: BA4095.

Com o alinhamento da sequência de *perA* da amostra BA4095 e da amostra controle E2369/48 foi possível comprovar a existência deste gene na amostra BA4095, contudo, não de forma íntegra. Foi possível a detecção de duas substituições de nucleotídeo no segundo e terceiro sítio de restrição de *SspI* respectivamente ( $T \rightarrow C^{nt413}$  e  $A \rightarrow G^{nt420}$ ), o que resultou na perda do perfil eletroferético esperado para esta amostra. Outra importante mutação encontrada foi uma deleção no nucleotídeo Timina 185, o que altera a leitura do gene. A mudança causada pela deleção de TTA para TAG (posição 184 para 186) gerou um códon de parada de transcrição. A figura 7 apresenta um esquema dessas alterações detectadas na sequência de *perA* da amostra 4095.





**Figura 7-** Figura esquemática de comparação do gene *perA* entre as amostras E2348/69 e BA4095. (A) Esquema de corte do gene *perA* inteiro da amostra E2348/69 pela enzima *SspI*. (B) Esquema de corte do amplicon do gene *perA* da amostra 4095 pela enzima *SspI*.

A figura 8 apresenta o alinhamento entre as sequências dos nucleotídeos de *perA* das amostras BA4095 e amostra controle E2348/69.

```

          10      20      30      40      50
BA4095
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
ATGCTTACATCTAAAAAAGAAATGCAGAGTTCAGAAAATAACAAGAGGA
          60      70      80      90     100
BA4095
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
GAATTTAGCGTTATTGTAACTAATTACATTTTCATATCAGAAATATAGTTA
          110     120     130     140     150
          ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|

```

BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc TATTTACGGGAGGAAATCAGTTTAAGATAAGAAACAAGAAAGAATTCACC  
TATTTACGGGGGGAATCAGTTTAAGATAAGAAACAAGAAAGAATTCACC

160 170 180 190 200  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc GAATATACAATAGAACCCAACTCCTTGTTTTTTT-AGCAAAAAACACTCA  
GAATACACAATAGAATCCAACCTCCTTGTTTTTTTGTAGCAAAAAACACTCA

210 220 230 240 250  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc TTGGGACATAGAAATTTGTCGGGATCGATAATAGTAATCCGTACAGGAAAA  
TTGGGACATGGAATTTGTCGGAATCGATAATAGTAATCCGTACAGGAAAA

260 270 280 290 300  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc TTATAAATTGATGATGCATTAATTAAGTTGCTGCATTCAATATCATCTGAT  
TTATAAATTGATGATGCATTAATTAAGTTGCTGCATTCAATATCATCTGAT

310 320 330 340 350  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc GACTCTTGTTATGTTAAAAAATAATTTACTGCGAACCTCAATGAAAT  
GACTCTTGTTATGTTAAAAAATAATTTACTGCGAACCTCAATGAAAT

360 370 380 390 400  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc GCAATTGAATATAGTTTTCAATATAAATTGAAGACATAAAACGCTCGGGTA  
GCAATTGAATATAGTTTTCAATATAAATTACAGACATAAAATACTCAGGCA

410 420 430 440 450  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc ACAACAAAAAATTTTAAAGATATTGTATTTATTATCTTTTTTTAACAAT  
ACAACAAAAAATTTTAAAAATTTGTATTTATTATCTTTTTTTAATGAT

460 470 480 490 500  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc CATAATGATATAATTAATGTCATCCTTAGTGCTTCATCTAAGAGCATCGT  
TATAATGATATAGTTAATGTCATCCTTAGTGCTTCATCTAAGAGCATCGT

510 520 530 540 550  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc AGACAGGGTTATAAAAGTAAATTGAGTTGGATATATCCAAAAACTGGAAC  
AGACAGGGTTATAAAAGTAAATTGAGTTGGATATATCCAAAAACTGGAAC

560 570 580 590 600  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc TAGGCGATGTCAGTAGTTCATGTTTATGAGTGATTCTTGCTGAGAAAA  
TAGGCGATGTCAGTAGTTCATGTTTATGAGTGATTCTTGCTGAGAAAA

610 620 630 640 650  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc CAATTAAACAAAGAGAACCTAACCTTTAAAAAATCATGTTAGATATAAA  
CAATTAAACAAAGAGAACCTAACCTTTAAAAAATCATGTTAGATATAAA

660 670 680 690 700  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc AATGAAACATGCTTCCTTTATTTTAAAGAACCTGATAAAAACATAGATG  
AATGAAACATGCTTCCTTTATTTTAAAGAACTACTGATAAAAACATAGATG

710 720 730 740 750  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc AAATATCTTGTGTTGGTTGGGTTAATTCACATCATATTTTATTAAGGTA  
AAATATCTTGTGTTGGTTGGGTTAATTCACATCATATTTTATTAAGGTA

760 770 780 790 800  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
BA4095  
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc T-----  
TTTTAAGGAATATTACAACAACACCAAAAAATATAATGGCGTTTATTC

```

                        810      820
                        .....|.....|.....|.....|.....|
BA4095
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc TATTACACAAGGAACATTGCCATAA

```

**Figura 8.** Alinhamento das seqüências de nucleotídeos para o gene *perA* obtida da amostra BA4095 com a amostra controle E2348/69

A seqüência de aminoácidos deduzida a partir da análise dos nucleotídeos do gene *perA* sequenciado da amostra BA 4095 foi alinhada com a correspondente seqüência da amostra de tEPEC E2348/69 (Figura 9).

```

                        10      20      30      40      50
                        .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BA4095
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc -----IVIFTGGNQFKIRNKKEFT
MLTSKKEMQSSENKQEENLALLLTNYISYQNIVIFTGGNQFKIRNKKEFT

                        60      70      80      90      100
BA4095
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc EYTIIEPNSLFFXAKNTHWDIEIVGIDNSNPYRKIIIDDALIKLLHSISSD
EYTIIESNSLFFLAKNTHWDM EIVGIDNSNPYRKIIIDDALIKLLHSISSD

                        110     120     130     140     150
BA4095
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc DSCYVKKKIIFTANLNEMQLNIVFNIIEDIKRSGNKKTFKILYLLSFFNN
DSCYVKKKIIFTANLNEMQLNIVSNIIIDIKYSGNKKIFKILYLLSFFND

                        160     170     180     190     200
BA4095
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc HNDIINVILSASSKSIVDRVIKVIELDISKNWKLGDVSSSMFMSDSCLRK
YNDIINVILSASSKSIVDRVIKVIELDISKNWKLGDVSSSMFMSDSCLRK

                        210     220     230     240     250
BA4095
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc QLNKENLTFKKIMLDIKMKHASLFLRRTDKNIDEISCLVGFNSTSYFIKV
QLNKENLTFKKIMLDIKMKHASLFLRRTDKNIDEISCLVGFNSTSYFIKV

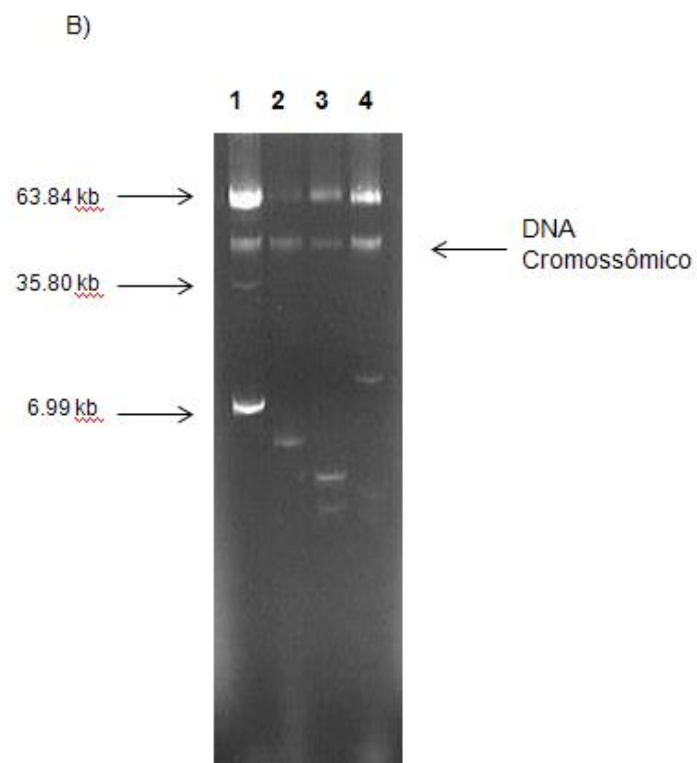
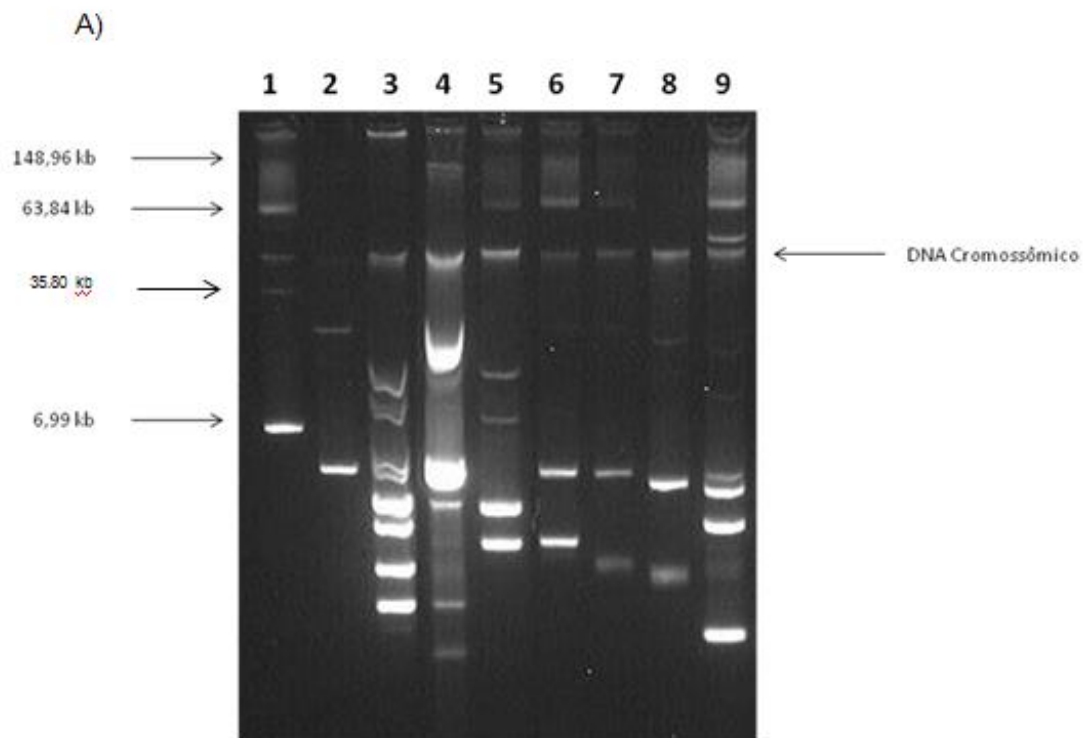
                        260     270
BA4095
gb|DQ388534.1|:17176-18000 Esc X-----
FKEYYNTTPKKYNGVYSITQGTLP*

```

**Figura 9.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir da seqüência de nucleotídeos de *perA* da amostra BA4095 e da amostra controle E2348/69.

#### 4.4 Extração Plasmidial

A extração plasmidial das 14 amostras de aEPEC positivas para os genes *perABC* foi realizada e o perfil plasmidial está apresentado na figura 10.



**Figura 10-.** Perfil plasmidial das amostras de aEPEC positivas para os genes

*perABC*. A) Canaleta 01 (36R861); 02 (E2348/69); 03 (BA558); 04 (BA1444); 05 (BA2853); 06 (BA3157); 07 (BA3851); 08 (BA4095); 9 (BA4192). B) Canaleta 01 (36R861); 02 (E2348/69); 03 (BA2034); 04 (BA2482)

As amostras BA530 e BA5733 não apresentaram plasmídeos detectáveis por esta técnica. As demais amostras pesquisadas apresentaram plasmídeos tanto de alto (~148 Kb) como de baixo (~ 0,5 Kb) peso molecular representando perfis plasmidiais distintos.

## 5. Discussão

De acordo com a necessidade de analisar a presença e a viabilidade dos genes *perABC* em amostras de aEPEC, iniciamos a pesquisa pela análise da presença deste operon.

Nessa análise, dentre as 72 amostras estudadas, 14 apresentaram ao menos um dos genes do operon *perABC*, sendo 7 delas positivas para *perABC*, 5 positivas para *perBC* e 2 positivas para *perB*. Estudos conduzidos por outros grupos de pesquisa (CONTRERAS et al., 2009; GOMES et al., 2004; DULGUER et al., 2003) já haviam identificado o gene *perA* em amostras de aEPEC, porém nunca havia sido realizado o teste de viabilidade deste gene nestas amostras, se o mesmo estava íntegro e sendo transcrito.

Após a confirmação da presença dos genes do operon *perABC* por PCR foi realizado o teste de RFLP-PCR nas amostras positivas para o gene *perA* por meio da digestão com a enzima *SspI*, conforme proposto por Okeke et al (2001) para análise de viabilidade do gene.

As sete amostras de aEPEC positivas para *perA* foram submetidas a este teste e nenhuma apresentou o padrão de restrição da amostra controle E2364/48. Okeke et al. (2001) verificaram por meio deste teste a existência de três variações de perfil de restrição gerados a partir de alterações no sítio de restrição da enzima *SspI* (5'-AAT/ATT-3'), os quais podem ser visualizados em corrida eletroforética em gel de agarose. O perfil gerado pela amostra controle E2369/48, onde o gene encontra-se íntegro e funcional, mostra uma banda de cerca de 90 pb, uma banda de 300 pb e outra de cerca de 380 pb. O gene íntegro é cortado pela enzima *SspI* em 4 sítios específicos (nucleotídeos 326, 413, 422 e 760), porém, um dos fragmentos, de 7 pb, não pode ser visualizado no gel. Os demais perfis descritos por Okeke et al. (2001), nos quais *perA* não está íntegro e, portanto, *perABC* não é transcrito, incluem os seguintes fragmentos de restrição: um perfil contendo fragmentos de 370 e 400 pb e outro perfil com um único fragmento de 770 pb. Todos esses perfis são resultantes de mutações não funcionais que alteram os sítios de restrição de *SspI*.

Das amostras utilizadas neste estudo e submetidas ao RFLP-PCR duas demonstraram um dos padrões descrito por Okeke et al. (2001), no qual observam-se dois fragmentos de 370 pb e 400 pb, sugerindo um gene não funcional. Quatro

amostras apresentaram o segundo padrão, também indicando *perA* não funcional, no qual o gene não é cortado pela enzima, resultando em um fragmento de 770pb.

Surpreendentemente, uma amostra apresentou um terceiro padrão de restrição, não conhecido na literatura, composto por dois fragmentos de 276 pb e 464 pb.

Com o sequenciamento do gene *perA* da amostra BA4095 foi possível determinar que por conta de uma deleção, que gera um códon de parada de transcrição, o gene não encontra-se íntegro e funcional. Além desta deleção a amostra possui algumas outras mutações, o que leva a um perfil de restrição diferente dos outros quando observado em gel de agarose.

Abe et al. (2009) já haviam demonstrado o perfil das amostras caracterizadas neste estudo quanto à reatividade com a sonda EAF e o gene *bfpA*, e adesão a células epiteliais. Os resultados do estudo conduzido por Abe et al. (2009) acrescidos dos resultados referentes à presença do operon *perABC* conduzidos neste estudo estão descritos no anexo 1. Em resumo não houve associação entre sorotipo ou padrão de adesão e a presença dos genes do operon *perABC*.

O operon *perABC* e os genes que codificam a fímbria BFP encontram-se, em amostras de tEPEC, inseridos no plasmídeo EAF. Conforme descrito no anexo 1, todas as amostras foram negativas para o fragmento sonda EAF, contudo três delas foram positivas para o gene *bfpA* (que codifica a maior subunidade da fímbria BFP) em pesquisa por PCR. Nessas amostras foi realizado teste de marcação por imunofluorescência para fímbria BFP, utilizado para confirmar a existência da fímbria BFP expressa na bactéria; o teste teve resultado negativo nas três amostras de aEPEC positivas para *bfpA* (ABE et al., 2009). Esses dados confirmam a classificação das amostras estudadas como aEPEC.

As 14 amostras positivas para os genes do operon *perABC* tiveram os plasmídeos extraídos para verificação de perfil plasmidial. Em comparação com a amostra E2348/69, que apresenta o plasmídeo EAF de 50 a 70 MDa (STONE et al., 1996). Com exceção de duas amostras (BA558 e BA3733), todas apresentaram plasmídeos tanto de alto quanto de baixo peso molecular, com os tamanhos variando de cerca de 147 kb a plasmídeos com menos de 6,9 kb. Nestas amostras os genes do operon *perABC* podem estar inseridos tanto no cromossomo quanto em outros plasmídeos que não o pEAF, exceto pelas amostras BA558 e BA3733, que

por conta de não possuírem plasmídeos devem albergar esses genes em seu cromossomo. Essa mobilidade provavelmente se dá ao fato do operon estar inserido entre duas sequências de inserção, que são elementos genéticos móveis, encontrados em várias pares do genoma bacteriano.

Em resumo, aEPEC pode apresentar genes do operon *perABC* mesmo na ausência da sequência EAF e na ausência da expressão da fímbria BFP. Entretanto, em algumas amostras este operon é incompleto, e em outras, onde os três genes são encontrados, *perA* é truncado interrompendo a total transcrição do operon. A expressão de algumas características de virulência, tais como a adesão e formação da lesão A/E, é atrasada em aEPEC em comparação com tEPEC (HERNANDES et al., 2009; ABE et al., 2009). Os nossos resultados indicam que a falta de ativação de LEE por Per em aEPEC pode ser a causa desse atraso.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, podemos afirmar que o uso do gene *perA* como marcador molecular para classificação e diferenciação entre EPEC típica e EPEC atípica não é o suficiente. A diferenciação entre EPEC típica e atípica pode continuar a ser realizada de acordo com os marcadores moleculares (*perABC*, fragmento EAF ou *bfpA*), mas deve ser feita principalmente a partir de resultados de expressão da fímbria BFP, a qual é presente somente em amostras de tEPEC (HERNANDES et al., 2009).



## 6. Conclusões

- ✓ Amostras de aEPEC negativas para o fragmento sonda EAF podem carrear os genes do operon *perABC* não funcionais.
- ✓ Nas amostras estudadas o operon pode estar inserido, de forma íntegra ou não, em plasmídeos ou até mesmo no cromossomo bacteriano.

## 7. Referências

- ABE CM, TRABULSI LR, BLANCO J, BLANCO M, DAHBI G, BLANCO JE, MORA A, FRANZOLIN MR, TADDEI CR, MARTINEZ MB, PIAZZA RMF, ELIAS WP. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) EAF-negative stx(-) genetic profile. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 64: 357-365. 2009.
- BLACK RE, COUSES S, JOHNSON HL, LAWN JE, RUDAN I, BASSANI DG, JHA P, CAMPBELL H, WALKER CF, CIBULSKIS R, EISELE T, LIU L, MATHERS C. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet** 375:1969 –1987. 2010.
- BRINKLEY C, BURLAND V, KELLER R, ROSE DJ, BOUTIN AT, KLINK AS, BLATTNER FR, KAPER JB. Nucleotide Sequence Analysis of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Adherence Factor Plasmid pMAR7. **Infect. Immunity.** 74: 5408-5413. 2006.
- BUERIS V, SIRCILLI MP, TADDEI CR, SANTOS MF, FRANZOLIN MR, MARTINEZ MB, FERRER SR, BARRETO ML, TRABULSI LR. Detection of *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** 102: 839-844. 2007.
- BUSTAMANTE VH, VILLALBA ML, GARCÍA-ANGULO VA, VÁZQUEZ A, MARTÍNEZ RJ, PUENTE JL. PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 82: 398-415. 2011.
- CONTRERAS CA, OCHOA TJ, LACHER DW, DEBROY C, NAVARRO A, TALLEDO M, DONNENBERG MS, ECKER L, GIL AI, LANATA CF, CLEARY TG. Allelic variability of critical virulence genes (eae, bfpA and perA) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. **J. Med. Microbiol.** 59: 25-31. 2010.
- DULGUER MV, FABBRICOTTI SH, BANDO SY, MOREIRA-FILHO CA, FAGUNDES-NETO U, SCALETSKY IC. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains: Phenotypic and Genetic Profiling Reveals a Strong Association between Enteroaggregative E. coli Heat- Stable Enterotoxin and Diarrhea. **J. Infect. Dis.** 188: 1685-1694. 2003.
- GÓMEZ-DUARTE OG, KAPER JB. A Plasmid-Encoded Regulatory Region Activates Chromosomal eaeA Expression in Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect.**

- Immun.** 63: 1767-1776. 1995.
- GOMES TA, IRINO K, GIRÃO DM, GIRÃO VB, GUTH BE, VAZ TM, MOREIRA FC, CHINARELLI SH, VIEIRA MA. Emerging Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains?. **Emerg. Infect. Dis.** 10: 1851-1855. 2004.
- HERNANDES RT, ELIAS WP, VIEIRA MAM, GOMES TAT. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 297: 137:149. 2009.
- KAPER JB. Defining EPEC Proceedings of the International Symposium on the Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Rev. Microbiol.** 27:130-133. 1996.
- KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.** 2: 123-140. 2004.
- LEVINE MM, BERGQUIST EJ, NALIN DR, WATERMAN DH, HERNICK KB, YOUNG CR, SOTMAN S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but not produce heat labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet.** 27: 1119-1122. 1978
- MARTIN RG, ROSNER JL. The AraC transcriptional activators. **Curr. Opin. Microbiol.** 4:132-137. 2001.
- MARTINEZ-LAGUNA Y, CALVA E, PUENTE JL. Autoactivation and environmental regulation of bfpT expression, the gene coding for the transcriptional activator of bfpA in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 33:153-166. 1999.
- MELLIES JL, ELLIOT SJ, SPERANDIO V, DONNENBERG MS, KAPER JB. The *per* regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)- encoded regulator (Ler). **Mol. Microbiol.** 33: 296-306, 1999.
- NATARO JP, KAPER JB, ROBINS-BROWNE R, PRADO V, VIAL P, LEVINE MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.** 6: 829-831. 1987
- NATARO JK, KAPER JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11:142-201. 1998.
- NETER E, WHESTEPHAL O, LÜDERITZ O, GINO RM, GORZYNSKI EA. A demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics.** 16: 801-808. 1955.
- OCHOA TJ, CONTRERAS CA. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in

- children. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 24:478-483. 2011.
- OKEKE IN, BORNEMAN JÁ, SHIN S, MELLIES JL, QUINN LE, KAPER JB. Comparative Sequence Analysis of the Plasmid-Encoded Regulator of Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. **Infect. Immun.** 69: 5553-5564. 2001.
- PETRI WA Jr, MILLER M, BINDER HJ, LEVINE MM, DILLINGHAM R, GUERRANT RL. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **J. Clin. Invest.** 118:1277-1290, 2008.
- PIERCE BA. **Genética, Um Enfoque Conceitual.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ. 2004
- SAMBROK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular Cloning: **A Laboratory Manual,** New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- SANTOS, MF. **Análise do perfil plasmidial e dos fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas atípicas (a-EPEC).** 2009. Tese de doutorado em biotecnologia – Instituto de ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- SCALETSKY IC, SILVA ML, TRABULSI LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.** 45:534-536. 1984.
- SCALETSKY IC, PEDROSO MZ, OLIVIA CA, CARVALHO RL, MORAIS MB, FAGUNDES-NETO U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.** 67: 3410-3415. 1999.
- STONE KH, ZHANG LC, DONNENBERG M. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. **Mol. Microbiol.** 20:325-337. 1996.
- TOBE T, SCHOOLNIK GK, SOHEL I, BUSTAMANTE VH, PUENTE JL. Cloning and characterization of bfpTVW, genes required for the transcriptional activation of bfpA in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 21: 963-975. 1996.
- TOBE, T., HAYASHI, T., HAN, C.G., SCHOOLNIK, G.K., OHTSUBO, E., SASAKAWA, C. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. **Infect. Immun.** 67: 5455-5462. 1999

VIEIRA AM, ANDRADE JR, TRABULSI LR, ROSA AC, DIAS AM, RAMOS SR, FRANKEL G, GOMES TA. Phenotypic and Genotypic Characteristics of *Escherichia coli* Strains on Non-Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Serogroups that Carry eae and Lack the EPEC Adherence Factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.** 183: 762-772. 2001

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Programme for Control of Diarrhoeal Diseases. Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections. **World Health Organization**, Geneva. 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Improving diarrhea estimates. Child and adolescent health and development. **World Health Organization**, Geneva, 2002.

## ANEXOS

Anexo 1. Características genotípicas e fenotípicas das amostras de aEPEC positivas para os genes do operon *perABC*<sup>a</sup>

Amostra (Sorotipo)	Genes do operon <i>perABC</i>	EAF	<i>bfpA</i>	Imunofluorescência para BFP	Padrão de adesão em células hep-2
BA1244 (O55:H7)	<i>perB</i>	-	-	NT <sup>b</sup>	Localizada-like
BA3733 (O119:H19)	<i>perB</i>	-	-	NT	Localizada-like
BA580 (O119:H2)	<i>perBC</i>	-	-	NT	Não aderente
BA714 (O111:H-)	<i>perBC</i>	-	-	NT	Localizada-like
BA2853 (ONT:H10)	<i>perBC</i>	-	-	NT	Localizada-like
BA3443 (O88:H25)	<i>perBC</i>	-	-	NT	Não aderente
BA3851 (ONT:H38)	<i>perBC</i>	-	-	NT	Localizada-like
BA558 (O111:H40)	<i>perABC</i>	-	+	-	Localizada
BA1444 (O115:H8)	<i>perABC</i>	-	-	NT	Indefinido
BA2034 (ONT:H10)	<i>perABC</i>	-	-	NT	Localizada-like
BA2482 (O119:H11)	<i>perABC</i>	-	+	-	Agregativa
BA3157 (O119:H2)	<i>perABC</i>	-	-	NT	Localizada-like
BA4095 (O4:H45)	<i>perABC</i>	-	+	-	Localizada-like
BA4192 (O111:H25)	<i>perABC</i>	-	-	NT	Indefinido

<sup>a</sup> Os resultados de sorotipagem, imunofluorescência para BFP, padrões de adesão em células HEp-2 e detecção do gene *bfpA* e do fragmento sonda EAF foram extraídos de Abe et al. (2009).

<sup>b</sup> NT, não testado.