

Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Rosane Mansan Almeida

***Escherichia coli* de adesão difusa (DAEC)  
isoladas de crianças e de adultos constituem  
duas populações diferentes**

Brasília, abril de 2013.

Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

***Escherichia coli* de adesão difusa (DAEC)  
isoladas de crianças e de adultos constituem  
duas populações diferentes**

Tese apresentada ao  
Departamento de Biologia Celular  
da Universidade de Brasília como  
requisito parcial para obtenção  
do título de Doutor em Biologia  
Molecular.

**Orientadora: Dra. Loreny Gimenes Giugliano**

**Coorientador: Dr. Alex Leite Pereira**

Brasília, abril de 2013.

***Escherichia coli* de adesão difusa (DAEC)  
isoladas de crianças e de adultos constituem  
duas populações diferentes**

**Banca de Defesa**

**Dr.<sup>a</sup> Loreny Gimenes Giugliano**

**(Orientadora - UnB – Departamento de Biologia Celular)**

**Dr.<sup>a</sup> Rosa Maria Silva**

**(Membro Externo – UNIFESP- Universidade Federal de São Paulo)**

**Dr.<sup>a</sup> Marlene Teixeira de Souza**

**(UnB – Departamento de Biologia Celular)**

**Dr.<sup>a</sup> Andréa Queiroz Maranhão**

**(UnB – Departamento de Biologia Celular)**

**Dr. Robert Neil Gerard Miller**

**(UnB – Departamento de Biologia Celular)**

**Dr.<sup>a</sup> Cynthia Maria Kyaw**

**(Suplente- UnB – Departamento de Biologia Celular)**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Loreny Giugliano, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao amigo de longa data e coorientador Alex Leite Pereira, também conhecido como “cabeção”, pelos múltiplos auxílios e pelas histórias “de um amigo dele” na hora do almoço.

À Professora Andrea Maranhão, pelo auxílio com os ensaios de ELISA e os sequenciamentos.

Ao Ricardo, do Lab Gene, pelos inúmeros empréstimos de material.

À Professora Cynthia, também pelos inúmeros empréstimos.

À Professora Anamélia Bocca, pelos camundongos.

Ao Professor Robert Miller, pela revisão do artigo.

À professora Sônia Bao e a toda equipe do laboratório de Microscopia da UnB - Filipe, Raphael, Lauro, Débora e em especial à Ingrid - pelo apoio imprescindível.

Ao Bernardo Vinhosa, por tudo.

“Eu posso estar completamente enganado, eu posso estar correndo pro lado errado, mas a dúvida é o preço da pureza, e é inútil ter certeza.”

Engenheiros do Havaí

## RESUMO

*Escherichia coli* de adesão difusa (DAEC) é considerada uma categoria diarreiogênica de *E. coli*. Essas cepas são identificadas pelo padrão de adesão em cultura de células. A maioria das cepas DAEC possui adesinas da família Afa/Dr. Sua patogenia tem sido muito discutida, embora alguns fatores de virulência já tenham sido propostos. O objetivo principal deste trabalho foi comparar cepas DAEC Afa/Dr isoladas de crianças e de adultos, a partir da análise de características relacionadas à virulência e à formação de biofilmes. Cepas DAEC Afa/Dr oriundas de crianças e adultos apresentaram marcantes diferenças na distribuição de características. Na coleção de adultos, uma nova adesina da família Afa/Dr foi associada aos casos de diarreia. Cepas de crianças, principalmente as de controles, apresentaram grande diversidade de adesinas Afa/Dr, nenhuma delas associada à diarreia. As cepas DAEC mostraram habilidade aumentada de formação de biofilme quando associadas a uma cepa de *Citrobacter freundii*. O aumento da formação de biofilme foi associado a maior capacidade de adesão a células cultivadas, indicando que cepas DAEC podem apresentar maior capacidade de colonização, dependendo dos parceiros, o que por sua vez, poderia aumentar a efetividade de uma toxina, como SAT - encontrada em número significativamente superior em cepas isoladas de casos de diarreia em crianças. A expressão de curli em meio CRI por cepas DAEC produziu um fenótipo adicional aos conhecidos em *Enterobacteriaceae*. A frequência de curli foi significativamente associada aos casos de diarreia em adultos, sugerindo que curli é um possível fator de virulência nessas bactérias. Genes do TTSS e sorogrupos clássicos de EPEC foram encontrados apenas nas cepas de crianças. Somados, os resultados indicam que cepas DAEC Afa/Dr isoladas de adultos e de crianças constituem duas populações diferentes.

**Palavras-chave:** DAEC, adesão difusa, biofilmes

## ABSTRACT

Diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC) is considered a diarrheagenic category of *E. coli*. Those strains are identified by their adhesion pattern in cell cultures. Most DAEC strains possess adhesins belonging to the Afa/Dr family. Their pathogenicity has been widely discussed, although some virulence factors have already been proposed. This work's main goal is to compare DAEC Afa/Dr strains isolated from children and adults, by analyzing characteristics related to virulence and biofilm formation. DAEC Afa/Dr strains from children and adults present remarkable differences in the distribution of the studied characteristics. Among strains from adults, a new adhesin from the Afa/Dr family was associated to cases of diarrhea. Strains from children, especially those isolated from control, present great diversity of Afa/Dr adhesins, none associated with diarrhea. DAEC strains showed an increase in biofilm formation when associated to a strain of *Citrobacter freundii*. The increase in biofilm formation was associated to a greater adhesion capacity in cultivated cells, indicating that DAEC strains can present a greater capacity for colonization depending on its partners, which, in turn, could increase the effectiveness of toxins, such as SAT - found in significantly higher numbers in strains isolated from cases of diarrhea in children. The expression of curli in the CRI medium produced an additional phenotype, as well as others previously described for *Enterobacteriaceae*. The prevalence of curli was significantly associated to cases of diarrhea in adults, indicating that curli could be a possible virulence factor in those bacteria. Genes from the TTSS and classical EPEC serogroups were found exclusively in strains from children. Taken together, these results indicate that DAEC Afa/Dr strains isolated from adults and children constitute two different populations.

**Keywords:** DAEC, diffuse adhesion, biofilms

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	14
2- OBJETIVOS.....	30
2.1 - Objetivo geral.....	30
2.2 - Objetivos específicos .....	30
3- MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.1 – Amostras bacterianas.....	31
3.2- Critérios de definição de cepas DAEC .....	33
3.3- Critérios de exclusão.....	33
3.4- Identificação de adesinas Afa/Dr .....	33
3.5- Caracterização genética das cepas DAEC .....	34
3.6- Determinação da motilidade das cepas .....	36
3.7- Ensaio de formação de biofilme .....	36
3.8- Manutenção de células HeLa.....	37
3.9- Ensaio de adesão .....	38
3.10- Produção de curli e celulose .....	39
3.11- Extração de proteínas de superfície .....	40
3.12 - Obtenção de anticorpo anti-AfaX.....	40
3.13 - Ensaio de “Western blot”.....	40
3.14 - Contrastação negativa (Microscopia eletrônica de transmissão) .....	41
3.15 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	41
3.16 – Sequenciamento .....	42
3.17 – Bioinformática .....	42
3.18 - Análise estatística .....	42
4- RESULTADOS .....	43
4.1- Frequência de DAEC Afa/Dr .....	43
4.2 - Adesinas Afa/Dr.....	45



4.3- Caracterização de Afa-X.....	48
4.4 - Distribuição de características associadas à virulência .....	51
4.5 - Componentes dos biofilmes.....	54
4.6 - Associação entre curli e <i>afaE</i> .....	59
4.7 - Sorogrupos clássicos de EPEC .....	59
4.8 - Formação de biofilme.....	62
4.9 - Biofilmes mistos .....	62
4.10 - Adesão a células HeLa .....	66
4.11 - Inibição da formação de biofilmes por zinco .....	69
5- DISCUSSÃO.....	72
6- CONCLUSÃO .....	83
7- PERSPECTIVAS .....	84
8- REFERÊNCIAS .....	85
9- ANEXO A – Meios de cultura e soluções utilizados.....	99
10- ANEXO B – <i>afaE-1</i> (sequência parcial) de cepa <i>afaE-1<sup>+</sup>/afaE-2<sup>+</sup></i> .....	106
11- ANEXO C – <i>afaE-2</i> (sequência parcial) de cepa <i>afaE-1<sup>+</sup>/afaE-2<sup>+</sup></i> .....	112
12- ANEXO D – Gene <i>afa-X</i> .....	114
13- ANEXO E – Putativa proteína Afa-X.....	115
14- ANEXO F – Domínio conservado presente na putativa proteína Afa-X e outras proteínas Afa/Dr .....	120
15- ANEXO G – Artigo originado a partir deste trabalho .....	121

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Padrões de adesão de cepas de <i>E. coli</i> em células HeLa	18
Figura 2	Organização dos operons <i>afa/dr</i>	20
Figura 3	Modelo de patogenia proposto para cepas de DAEC Afa/Dr	23
Figura 4	Aspecto de colônias bacterianas cultivadas nos meios CRI e calcoflúor	39
Figura 5	Alinhamento entre a sequência de <i>afa-X</i> e a sequência de <i>drbE121</i> .	49
Figura 6	Análise da proteína Afa-X	50
Figura 7	Microscopia eletrônica de transmissão (contrastação negativa)	56
Figura 8	Formação de biofilmes simples e mistos por cepas DAEC Afa/Dr	64
Figura 9	Aumento relativo na formação de biofilmes mistos	65
Figura 10	Ensaio de adesão a células HeLa	67
Figura 11	Ensaio quantitativo de adesão sobre células HeLa	68
Figura 12	Micrografias eletrônicas de biofilmes mistos	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Adesinas da família Afa/Dr	20
Tabela 2	Cepas bacterianas utilizadas como controle neste estudo	32
Tabela 3	Iniciadores utilizados neste trabalho	35
Tabela 4	Distribuição das cepas DAEC Afa/Dr isoladas de adultos e crianças	44
Tabela 5	Distribuição dos genes das adesinas Afa/Dr em cepas DAEC isoladas de casos de diarreia e de controles assintomáticos	47
Tabela 6	Características associadas à virulência em cepas DAEC Afa/Dr isoladas de crianças e adultos	53
Tabela 7	Componentes da matriz de biofilmes detectados em cepas de adultos e crianças	57
Tabela 8	Morfotipos exibidos por cepas DAEC Afa/Dr em meio CRI a 37°C	58
Tabela 9	Associação entre curli e afaE em cepas de adultos	60
Tabela 10	Sorogrupos clássicos de EPEC em cepas isoladas de crianças	61
Tabela 11	Inibição por zinco de biofilmes simples e mistos	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDA – adhesin involved in diffuse adhesion

bdar – brown, dry and rough

CEA – antígeno carcinoembriônico

CEACAMs – CEA-related cell adhesion molecules

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

CRI – Congo red indicator

DAEC – *Escherichia coli* de adesão difusa

DAF – decay accelerating factor

EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa

EAF – EPEC adherence factor

EGFR - epidermal growth factor receptor

EHEC – *Escherichia coli* enteroemorrágica

EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasiva

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica

GRP94 - glucose-regulated protein

IL-8 – Interleucina 8

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta

MHC – *Major compatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)

MS – Ministério da Saúde

OD – *optical density* (densidade ótica)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

pdar – Pink, dry and rough

rdar – red, dry and rough

NETs – neutrophil extracellular traps

SAT – secreted autotransporter toxin

SFB – Soro fetal bovino

SPATEs – serino proteases autotransportadoras de *Enterobacteriaceae*

saw – smooth and white

T reg – Linfócito T regulatório

TGF $\beta$  – fator de crescimento tumoral beta

Th 17 – Linfócito T auxiliar produtor de interleucina 17

TLR – toll like receptor

TNF $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

TSP1 - Thrombospondin-1

TTSS – sistema de secreção do tipo III

UFC – Unidades formadoras de colônia

UPEC – *Escherichia coli* uropatogênica

ZO – zonula ocludens

## 1- INTRODUÇÃO

As doenças diarreicas são uma das principais causas de morbimortalidade em crianças menores de cinco anos de idade. Estima-se que cerca de 10,5% das mortes nesta faixa etária tenham sido causadas por diarreia em 2010 (Liu *et al.*, 2012). Entretanto, as diferenças regionais são imensas, e a proporção de mortes por diarreia pode chegar a níveis bem mais elevados nos países menos desenvolvidos (Fischer Walker *et al.*, 2012).

No Brasil, a mortalidade por diarreia entrou em declínio nas últimas décadas; o número de mortes por diarreia entre os menores de um ano de idade caiu 93,9% em 25 anos (de 1980 a 2005), passando de segunda para quarta causa de mortalidade infantil. No mesmo período, o número total de mortes infantis caiu 71,3% (MS, 2012). No entanto, o mesmo fenômeno não ocorreu com a incidência da doença. O número de casos cresceu mais de quatro vezes no período entre 2000 e 2010 (MS, 2012). Em Brasília, no período de 1995 até 2005, cresceu o número de internações pela doença, o que pode indicar aumento do número de casos graves (Oliveira e Latorre, 2010). Dessa forma, apesar dos avanços conquistados nos últimos anos, as diarreias ainda constituem um relevante problema de saúde pública.

Diferentes agentes, de diferentes classes, como vírus e parasitas podem estar envolvidos na etiologia da diarreia infantil. Contudo, nos países menos desenvolvidos, o patógeno mais comum é *Escherichia coli* (Abba *et al.*, 2009). *E. coli* é um bacilo Gram-negativo que coloniza o trato gastrointestinal humano horas após o nascimento e convive pacificamente com seu hospedeiro com benefícios para ambos (Kaper *et al.*, 2004). Poucas linhagens são de fato patogênicas e a maior parte das cepas de *E. coli* é membro da microbiota intestinal normal humana.

A colonização do intestino humano pelas bactérias que compõe sua microbiota é um processo gradual. Logo após o nascimento, a microbiota materna é normalmente a principal fonte de inoculação (Tamelienè *et al.*, 2012; Vaishampayan *et al.*, 2010; Gueimont *et al.*, 2006). Fatores como o tipo de

parto – normal ou via cesareana - (Tameliené *et al.*, 2012; Dominguez-Bello *et al.*, 2010; Biasucci *et al.*, 2008) e o tipo de alimentação (Guaraldi e Salvatori, 2012) afetam a composição da microbiota em formação. Durante os primeiros meses, com uma dieta a base de leite, bactérias como as Bifidobacterias, altamente adaptadas a metabolizar os oligossacarídeos presentes no leite são geralmente abundantes (Sela *et al.*, 2008). Porém mesmo ingerindo apenas leite, pode haver grandes variações no microbioma (repertório genético dos micróbios) dos bebês. Palmer *et al.* (2007) documentaram flutuações na abundância dos principais grupos de bactérias, além de variações temporais diferentes em diferentes indivíduos.

A variação interpessoal na microbiota é maior entre as crianças do que entre os adultos. Além disso, os microbiomas intestinais das crianças são mais diversificados e exibem maior diversidade de funções genéticas que os microbiomas de adultos (Kurokawa *et al.*, 2007).

Com a introdução de alimentos sólidos inicia a transição para um padrão de microbiota semelhante ao do adulto (Palmer *et al.*, 2007), embora o aumento da complexidade da microbiota seja gradual. A maturação da microbiota em direção à microbiota de adultos, mais estável (Vanhoute *et al.*, 2004), é um processo que dura vários anos (Yatsunenکو *et al.*, 2012; Agans *et al.*, 2011).

*E. coli* está presente na microbiota intestinal tanto de adultos como de crianças, embora sua abundância relativa varie conforme a idade, já que esta espécie é dominante em crianças e subdominante em adultos (Mariat *et al.*, 2009). O nicho de *E. coli* é a camada mucosa do cólon; a bactéria é um concorrente de grande sucesso neste local, sendo a mais abundante bactéria anaeróbia facultativa. No entanto, existem vários clones altamente adaptados que adquiriram fatores de virulência específicos, os quais lhes conferem capacidade de se adaptar a novos nichos e permitem-lhes causar um largo espectro de doenças: infecções entéricas/diarreias, infecções do trato urinário e sepsis/meningite (Kaper *et al.*, 2004).

O fato desta bactéria ser habitante do intestino complica o diagnóstico das diarreias por *E. coli* e torna necessário o estabelecimento de critérios claros

para a distinção das cepas patogênicas. Com base na presença de determinadas características fenotípicas e/ou genotípicas, as cepas diarreio gênicas de *E. coli* foram divididas em seis categorias amplamente reconhecidas: EPEC (*E. coli* enteropatogênica); ETEC (*E. coli* enterotoxigênica); EHEC (*E. coli* enteroemorrágica); EIEC (*E. coli* enteroinvasiva); EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e DAEC (*E. coli* de adesão difusa). Cada uma dessas categorias distingue-se por um mecanismo de virulência específico: ETEC e EHEC pela produção de toxinas, EPEC e DAEC pela formação de lesões histopatológicas, EIEC por invasão celular e EAEC pela formação de biofilmes (Kaper *et al.*, 2004). Recentemente foi proposta a inclusão de duas novas categorias: AIEC (*E. coli* aderente e invasiva) e STEAEC (*E. coli* enteroagregativa produtora de Shiga toxina) (Clements *et al.*, 2012). Esta última foi proposta após o surto que teve início na Alemanha em 2011 e se espalhou por diversos países da Europa, além da América do Norte, tendo grande impacto sobre o comércio internacional de alimentos. Esse surto foi atribuído a uma cepa de *E. coli* O104:H4, com características mistas de EAEC e EHEC. Outras categorias também têm sido, às vezes, propostas. Entretanto, até o momento não existe consenso sobre novas categorias.

No Brasil, durante muito tempo, EPEC foi a classe de *Escherichia coli* mais frequentemente isolada de casos de diarreia em crianças, especialmente entre as menores de um ano. Por esta razão, muitos laboratórios realizam rotineiramente testes para detecção dos sorotipos (combinações dos antígenos somáticos “O” e flagelar “H”) ou sorogrupos (somente o antígeno O) mais comumente associados a essa categoria de *E. coli*. Nos últimos anos, no entanto, tem-se registrado uma diminuição da incidência de EPEC (Rodrigues *et al.*, 2004) e um incremento na de outras categorias de *E. coli* diarreio gênicas entre elas, DAEC (Rodrigues *et al.*, 2002; Spano *et al.*, 2008).

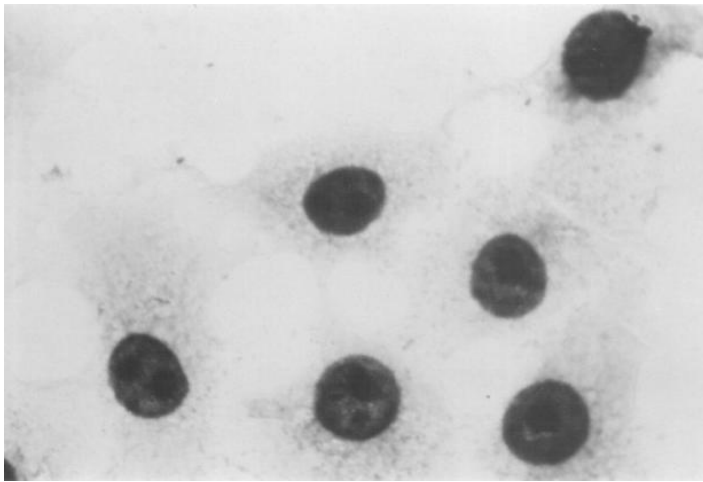
Apesar de incluída entre as *E. coli* diarreio gênicas, DAEC é ainda uma categoria bastante controversa. Essas bactérias são implicadas como agente etiológico de diarreia em crianças em alguns estudos (Baqui *et al.*, 1992; Guion *et al.*, 2008; Opintan *et al.*, 2010) enquanto em outros são encontradas em frequências similares em casos de diarreia e controles assintomáticos (Gomes *et al.*, 1989; Scaletsky *et al.*, 1999; Rajendran *et al.*, 2010).



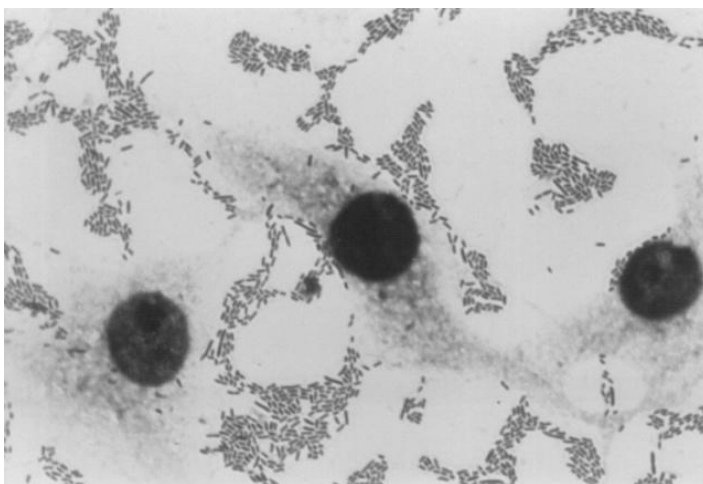
Suscetibilidade dependente da idade tem sido proposta para as infecções por DAEC. Alguns estudos epidemiológicos têm mostrado que DAEC são associadas a casos de diarreia apenas em crianças mais velhas, com pelo menos seis meses de idade (Scaletsky *et al.*, 2002; Ochoa *et al.*, 2009 a). Essas bactérias são também encontradas como agentes de diarreia em adultos (Meraz *et al.*, 2008), inclusive aqui no Distrito Federal (Piva, 1998; Almeida, 2003).

Outro fator que possivelmente tenha contribuído para a controvérsia sobre a patogenicidade de DAEC é o critério utilizado para sua identificação, que consiste em sua capacidade de aderir difusamente a células cultivadas. O termo “adesão difusa” foi utilizado inicialmente para cepas de *E. coli* que aderiam às células de cultura da linhagem Hep-2 sem formar “microcolônias”(Figura 1B), que são típicas de EPEC (Scaletsky *et al.*, 1984). Mais adiante, com a definição da categoria de *E. coli* enteroagregativa (Levine *et al.*, 1988), como aquelas que possuem adesão agregativa (Figura 1A), o termo adesão difusa ficou restrito às cepas que aderem de modo homogêneo, mais ou menos espalhado, sobre as células (Figura 1C). No entanto, adesão difusa *por si* parece não ser um bom critério para definição de uma categoria. Este padrão de adesão ocasionalmente ocorre em cepas que são consideradas como pertencentes a outros patotipos. Um exemplo são as EPEC “atípicas”, que não possuem o plasmídio EAF, geralmente presente em EPEC (Hernandes *et al.*, 2009). Desta forma, a utilização do padrão de adesão como único critério para classificação de cepas de *E. coli* parece levar a agrupar bactérias pouco relacionadas entre si, gerando confusão. Lopes *et al.* (2005) encontraram uma grande heterogeneidade entre cepas de adesão difusa, tanto em termos de fatores de virulência como de adesinas.

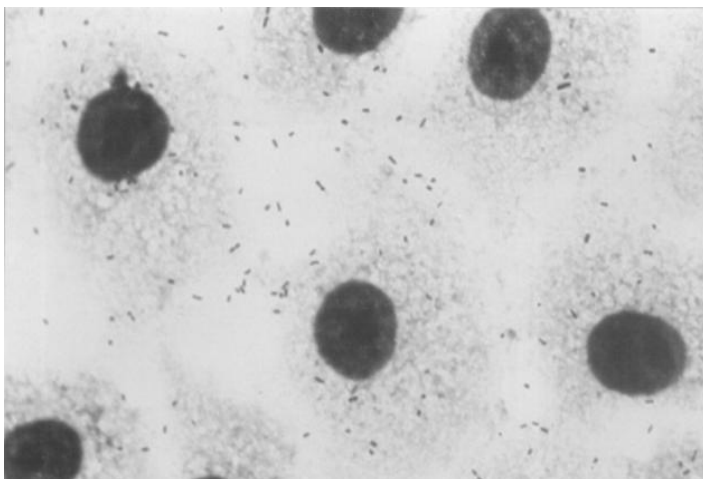
Algumas adesinas implicadas no fenótipo de adesão difusa já foram descritas. Yamamoto *et al.* (1996) descreveram uma proteína de membrana externa de 57 kDa. Benz e Schimidt (1989) descreveram uma proteína de 100 kDa que foi chamada AIDA (*adhesin involved in diffuse adhesion*). No entanto, essas adesinas não são comuns em DAEC, não sendo detectadas ou aparecendo em frequência muito baixa nos estudos epidemiológicos (Jallat *et al.*, 1994; Germani *et al.*, 1996; Scaletsky *et al.*, 2002).



A



B



C

**Figura 1 – Padrões de adesão de cepas de *E. coli* em células HeLa. A – Exemplo de bactéria não aderente; B- Bactéria mostrando padrão agregativo de adesão; C – Padrão difuso de adesão. Aumentos: 400 vezes.**

Em 1989 foi descrita a fímbria F1845, uma proteína de 14,3 kDa caracterizada a partir de uma cepa de adesão difusa (C1845) isolada de uma criança com diarreia (Bilge *et al.*, 1989). A partir da sequência genética dessa fímbria foi desenvolvida a sonda *daaC* como uma alternativa aos testes de adesão em cultura de células. O trabalho de Germani *et al.* (1996) mostrou que, entre as cepas de adesão difusa, apenas as que hibridizavam com a sonda *daaC* apareciam em frequência significativamente maior em casos de diarreia do que em controles assintomáticos. A partir daí, a sonda *daaC* passou a ser amplamente utilizada e ajudou a difundir a ideia de que F1845 era a fímbria comum (ou fímbria tipo) em DAEC.

Mais adiante, verificou-se que a sonda *daaC* não é específica para F1845, mas reconhece uma região conservada presente em outras adesinas da família Afa/Dr, caracterizada justamente em razão da similaridade de organização genética entre seus membros.

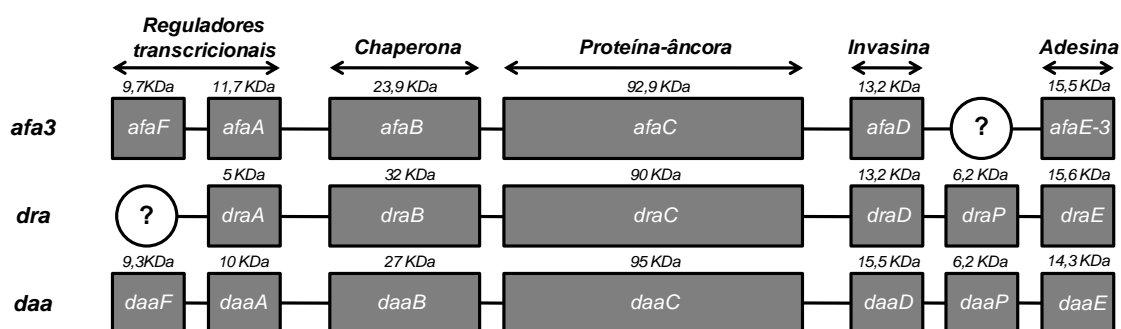
Estima-se que 75% das DAEC ao redor do mundo possuam adesinas da família Afa/Dr (Kaper *et al.*, 2004). Embora DAEC sejam definidas como as cepas que aderem difusamente a células cultivadas, na prática, a ampla utilização da sonda *daaC* e de iniciadores de PCR que reconhecem porções conservadas dos genes Afa/Dr têm levado a identificar cepas DAEC tanto pelo padrão de adesão difuso em células de cultura como pela presença dos genes das adesinas Afa/Dr.

A família Afa/Dr inclui as adesinas afimbriais Afa-I, II, III, V, VII e VIII, Nfa-I, as fímbrias Dr-I e II, AAF-I, II, III e F1845 (tabela 1). Em DAEC de origem intestinal são encontradas Afa-I, II, III e V e F1845 (Servin, 2005). Apesar das primeiras adesinas afimbriais terem sido descritas em *E. coli* uropatogênicas (UPEC) (Labigne-Roussel *et al.*, 1984; Labigne-Roussel e Falkow, 1988) sua ocorrência parece ser comum em cepas de origem intestinal (Almeida, 2003), enquanto F1845 parece ocorrer mais raramente (Campos *et al.*, 1999). Embora aparentemente menos frequentes, outras adesinas têm sido eventualmente descritas, como DrbE121 e DrbE131 (Zhang *et al.*, 1997).

**Tabela 1 – Adesinas da família Afa/Dr**

Adesina	Tipo	Hospedeiro	Receptor(es) e/ou ligantes	Categoria E. coli
AfaE-I	Afimbrial/fibrilar	Humano	DAF	DAEC
AfaE-II	Afimbrial	Humano	DAF	DAEC
AfaE-III	Afimbrial	Humano	DAF/CEACAMs	DAEC
AfaE-V	Afimbrial	Humano	DAF	DAEC
AfaE-VII	Afimbrial	Animal	DAF	
AfaE-VIII	Afimbrial	Animal/humano	DAF	
Dr	Fimbrial	Humano	DAF/CEACAMs colágeno tipo IV	UPEC
Dr-II	Não fimbrial	Humano	DAF	UPEC
F1845	Fimbrial	Humano	DAF/CEACAMs	DAEC
NFa-I	Não fimbrial	Humano	DAF	UPEC
AAF-I	Fimbrial	Humano	Desconhecido	EAEC
AAF-II	Fimbrial	Humano	GRP94,EGFR, TSP1*	EAEC
AAF-III	Fimbrial	Humano	Desconhecido	EAEC

\*Ligação à fibronectina, laminina e colágeno do tipo IV, entre outras, também já foi demonstrada (Konar *et al.*, 2012; Farfan *et al.*, 2008). Adaptado de Servin, 2005.



**Figura 2 – Organização genética dos operons afa/dr. Os operons da família Afa/Dr são constituídos de pelo menos cinco genes, nomeados de A a E. Alguns deles possuem genes adicionais (F e P), que codificam reguladores. Adaptado de Servin, 2005.**

Apesar de diferir fenotipicamente, as adesinas Afa/Dr apresentam uma mesma organização genética, com *operons* constituídos de pelo menos cinco genes, nomeados de A até E (Figura 2). O gene A codifica uma proteína regulatória, B codifica uma chaperona, e C, uma proteína âncora de membrana. Na adesina afimbrial Afa-III, as proteínas D e E formam a estrutura adesiva, onde E é a adesina propriamente dita (Garcia *et al.*, 1996). Os genes A até D representam um segmento altamente conservado, enquanto os genes E mostram maior variabilidade entre as sequências (Jouve *et al.*, 1997). Mesmo algumas sequências “E” mostram acentuada similaridade entre si, como Afa-III e hemaglutinina Dr, que diferem em apenas 3 aminoácidos (Le Bouguenec *et al.*, 1993). Todavia elas divergem tanto do ponto de vista morfológico como bioquímico. Por exemplo, a hemaglutinação conferida por Dr pode ser bloqueada pela adição de cloranfenicol, ao passo que aquela dada por Afa-III não é afetada (Zhang *et al.*, 1997).

A maioria das adesinas Afa/Dr compartilha DAF (*decay accelerating factor*; CD55) como receptor (Servin, 2005). Esta proteína de membrana, de ampla distribuição nos tecidos do corpo, protege as células de serem lisadas por complemento autólogo. Moléculas relacionadas a CEA (*carcinoembryonic antigen*; CD66e) conhecidas como CEACAMs (*CEA-related cell adhesion molecules*) também servem como receptores para a fímbria Dr, F1845, Afa-I e Afa-III (Tabela 1) (Berger *et al.*, 2004; Servin, 2005). Tanto DAF como os CEACAMs são recrutados em torno da bactéria após a ligação desta à célula hospedeira (Guignot *et al.*, 2000; Berger *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, diversos estudos envolvendo F1845 e Dr apontaram um papel para as adesinas Afa/Dr na patogenia de DAEC. Bernet-Camard *et al.* (1996) demonstraram que a ligação da cepa C1845 foi capaz de promover desmonte da rede de actina em células de linhagem intestinal (CaCo-2) totalmente diferenciadas, culminando no alongamento das microvilosidades nestas células. Peiffer *et al.* (1998) demonstraram que as alterações no citoesqueleto descritas por Bernet-Camard resultam da ativação de rotas de transdução de sinal dependentes da ligação de cálcio ao GPI (glicosilfosfatidilinositol) que ancora DAF à membrana da célula hospedeira. O resultado foi obtido tanto com cepa selvagem como com cepa recombinante,

mostrando a importância da interação adesina-receptor para deflagar a cascata de transdução de sinal. Esses resultados são corroborados pelo trabalho de Goluszco *et al.* (1999) mostrando que tanto bactérias expressando fímbria Dr, como esferas recobertas com a fímbria purificada, eram internalizadas pelas células. Eles observaram ainda que a agregação do receptor em torno das bactérias é associada com a redistribuição de proteínas associadas ao citoesqueleto, como ezrina e tropomiosina, além da actina.

O conjunto dos conhecimentos sobre a patogenia de cepas DAEC Afa/Dr levou ao desenvolvimento de um modelo cuja principal característica é o desmonte das microvilosidades de enterócitos (Figura 3). A idéia de que alterações do citoesqueleto com deformação de microvilosidades podem estar na base da patogenia de DAEC é apoiada pelos estudos com cepas de EPEC. Nessas últimas, a adesão e o contato íntimo da bactéria com a célula eucariótica são um primeiro passo na formação das lesões do tipo “attaching and effacing”. A seguir a bactéria injeta proteínas efetoras na célula através do TTSS (*type three secretion system* ou sistema de secreção do tipo III), um sistema do tipo agulha (Nataro e Kaper, 1998), que é encontrado em um grande número de bactérias Gram-negativas, a maioria patógenos, seja de plantas ou de animais, de vertebrados ou de invertebrados (Tampakaki, 2004). Evidências da presença de um sistema de secreção do tipo III em DAEC isoladas de casos de diarreia infantil foram demonstradas por Kyaw *et al.* (2003). A presença concomitante de adesinas Afa/Dr nessas cepas sugere a hipótese de uma via adesina-receptor-proteínas efetoras.

Embora o papel das adesinas fimbriais Dr e F1845 na patogenia encontre algum consenso na literatura, elas são raramente encontradas em DAEC diarreiogênicas, de forma que para aceitar que essas adesinas sejam responsáveis pela patogênese, seria preciso extrapolar os resultados obtidos nos trabalhos para outros membros da família Afa/Dr. Além disso, cepas Afa/Dr positivas também podem ser encontradas em frequências similares em casos de diarreia e controles em alguns trabalhos (Ochoa *et al.*, 2009 b), mesmo quando se consideram apenas as crianças mais velhas (Albert *et al.*, 1999), sugerindo que um fator ou fatores adicionais devem estar presentes nas cepas que causam diarreia.

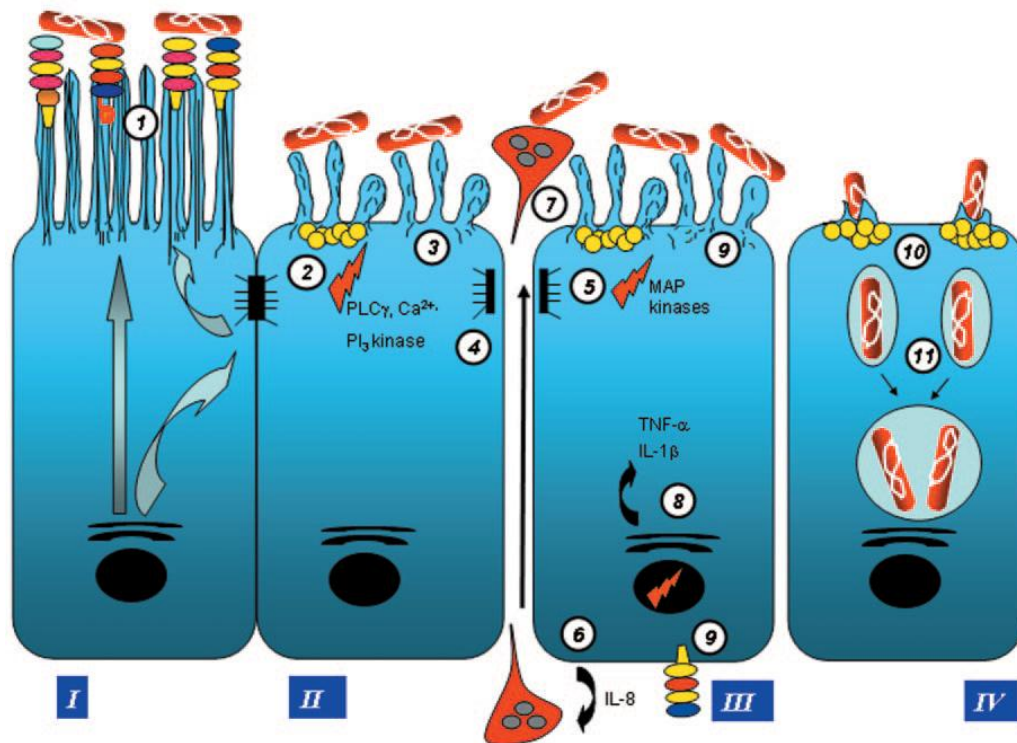


Figura 3 – Modelo de patogenia proposto para cepas de DAEC Afa/Dr. I – Interação de cepas DAEC Afa/Dr com células epiteliais; II – Perda de microvilosidades; III – Produção de IL-8 e recrutamento de PMNs; IV – Internalização da bactéria via domínios lipídicos. Círculos: 1- Interação de DAEC Afa/Dr com os receptores (DAF e CEACAMs) das adesinas Afa/Dr nas células hospedeiras; 2- via de sinalização envolvendo tirosina quinase, fosfolipase C e aumento do influxo de  $Ca^{2+}$ ; 3- levando ao rearranjo das proteínas F-actina e vilina, do citoesqueleto; as lesões estruturais são acompanhadas pela diminuição da expressão das proteínas funcionais SI, DPP IV, transportador de glicose SGLT1, e transportador GLUT5; 4 - O aumento da permeabilidade paracelular é associado com a reorganização das proteínas associadas às junções oclusivas ZO-1 e occludina; 5- Um mecanismo de sinalização MAPK-dependente leva à produção da citocina pró-inflamatória IL-8, 6- o que desencadeia a migração transepitelial de PMNLs; 7 – DAEC Afa/Dr interagem com PMNLs transmigrados, 8- promovendo a produção de  $TNF-\alpha$  e  $IL-1\beta$ , 9 – aumento na expressão de DAF e MICA e expressão anormal de DAF no domínio basolateral; 10 – Internalização da bactéria através de um mecanismo que envolve domínios lipídicos e microtúbulos dinâmicos; 11- Sobrevivência da bactéria em vacúolos secundários que resultam da fusão de vacúolos iniciais. Fonte: Servin, 2005.

Taddei *et al.* (2003) encontraram a toxina Sat (*secreted autotransporter toxin*), codificada pelo gene *sat*, em 100% das cepas Afa/Dr isoladas de infecções urinárias e em 44% dos isolados de origem intestinal. Esta toxina, que foi a primeira a ser relatada em DAEC, foi originalmente identificada em *E. coli* uropatogênicas (Guyer *et al.*, 2000) e pertence à família de serino proteases autotransportadoras de *Enterobacteriaceae* (SPATEs). Demonstrou-se que SAT é capaz de promover lesões em “tight junctions” de células da linhagem intestinal CaCo-2, alterando a distribuição das proteínas ZO1, ZO3 e ocludina e diminuindo sua expressão; tais alterações foram associadas a um aumento de permeabilidade nessas células (Guignot *et al.*, 2007). Essa toxina está presente nas cepas protótipos de DAEC Afa/Dr: C1845, KS52, A30 e IH11128 (Guignot *et al.*, 2007).

Outro fator que poderia estar envolvido na patogenia é a capacidade das cepas DAEC de induzir a secreção da citocina pró-inflamatória IL-8. No estudo epidemiológico de Meraz *et al.* (2007), alto nível de secreção de IL-8 em células de cultura foi o único fator, além da presença das adesinas Afa/Dr, significativamente associada à diarreia por DAEC em crianças de um a quatro anos de idade.

Nas diarreias causadas por EAEC, a presença de IL-8 nas fezes correlaciona-se com a gravidade da infecção. Nessas bactérias, o grande aumento na secreção desta citocina foi associado ao gene *fliC*, que codifica flagelina (Steiner *et al.*, 2000). Em DAEC, a capacidade de estimular a produção de IL-8 já foi atribuída à ligação da adesina Afa/Dr a DAF (Bétis *et al.*, 2003 a), à fímbria do tipo I (Sémiramoth *et al.*, 2009), ao flagelo (Arikawa e Nishikawa 2010) e à fímbria Dr (Diard *et al.*, 2009). Nesse último caso, o aumento da secreção de IL-8 é dependente da quinase ERK1/2, e induzido pela fímbria liberada no meio, cuja liberação, por sua vez, ocorre em resposta à presença de norepinefrina, numa complexa interação bactéria-hospedeiro.

Uma vez que as células tenham produzido IL-8, a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ) que se segue promove a regulação positiva de DAF (Bétis *et al.*, 2003 a). O aumento da expressão de DAF, por seu turno, poderia permitir que um maior número de



bactérias se ligasse ao enterócito, sugerindo que o estímulo da secreção de IL-8 possa exercer, ainda que indiretamente, um papel facilitador da colonização do epitélio por cepas DAEC.

Outra consequência já demonstrada da produção de IL-8, após a ligação de cepas DAEC, foi o recrutamento e a migração de leucócitos polimorfonucleares (Bétis *et al.*, 2003 b). Cepas DAEC mostram um nível reduzido de fagocitose pelos neutrófilos transmigrados, em relação a cepas não patogênicas de *E. coli*, e são capazes de induzir a apoptose dos neutrófilos (Brest *et al.*, 2004).

A fagocitose de células apoptóticas induz a síntese de TGF- $\beta$  (Serhan e Savill, 2005) que, entre outras funções, medeia a diferenciação dos linfócitos Th17 e T reg (Stockinger e Veldhoen, 2007), implicados na manutenção da homeostase intestinal (Honda e Takeda, 2009), com funções opostas: as Treg são células supressoras, enquanto as Th17 são inflamatórias e atuam na resposta imune contra bactérias extracelulares (Stockinger e Veldhoen, 2007). Dessa forma, a modulação da resposta imune a DAEC estaria mais uma vez ligada à sua capacidade de ativar a produção de IL-8.

Recentemente foi demonstrado que a cepa padrão de DAEC C1845 é capaz de induzir “netose” em neutrófilos cultivados (Marin-Esteban *et al.*, 2012). A netose (também chamada etose em outras linhagens celulares) é um processo ativo de morte celular em neutrófilos que leva à liberação de NETs (*neutrophil extracellular traps*), que são complexos de cromatina descondensada com proteínas, a maioria granulares. NETs possuem atividade antimicrobiana: formam estruturas que aprisionam microrganismos, além de conter proteínas capazes de mata-los ou inibi-los, ou ainda, proteínas que clivam fatores de virulência específicos (Brinkmann e Zychlinsky, 2012). Marin-Esteban *et al.* demonstraram que NETs induzidos pela infecção com a cepa C1845 são capazes de matar a bactéria, mas também de lesar o citoesqueleto de células de linhagem intestinal. Dessa forma, a ação dos NETs pode estar relacionada aos efeitos deletérios da infecção por C1845 – e talvez de outras DAEC Afa/Dr.

Atualmente, muita atenção vem sendo dada ao papel dos biofilmes nas infecções. Em *E. coli* diarreio gênicas, o interesse vem aumentando a partir dos estudos com EAEC. Esta, que tem sido apontada como uma das categorias mais frequentes em casos de diarreia (Huang e Dupont, 2004) não forma lesões histopatológicas típicas e a capacidade de formar biofilmes é seu único fator de virulência consensual (Huang *et al.*, 2006). Recentemente, formação de biofilme e comportamento multicelular têm sido descritos em outras categorias de *E. coli*, como EPEC atípicas (Weiss-Muszkat *et al.*, 2010) e STEC (Biscola *et al.*, 2011). Em DAEC, autoagregação e formação de biofilme foi relatada, até o momento, apenas para cepas que expressam a adesina AIDA (de ocorrência rara em DAEC), isoladas tanto de humanos como de animais (Sherlock *et al.*, 2004; Ravi *et al.*, 2007).

Um biofilme é definido como uma comunidade microbiana séssil, caracterizada por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato - ou a uma interface ou umas às outras - são embebidas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares que elas produziram, e exibem um fenótipo alterado com respeito à taxa de crescimento e transcrição gênica (Donlan e Costerton, 2002). Esta definição não inclui as colônias bacterianas crescidas em ágar, que apesar de aderidas a um substrato exibem características fisiológicas semelhantes às das células planctônicas.

Entre os benefícios que uma comunidade bacteriana pode obter a partir da formação de biofilmes estão: resistência a antimicrobianos, proteção contra predação por protozoários e proteção contra as defesas do hospedeiro (Mah e O'Toole 2001; Matz e Kjelleberg 2005; Anderson e O'Toole 2008).

A resistência aumentada a antibióticos é o principal problema a ser enfrentado nas infecções envolvendo biofilmes. Diversos fatores podem estar implicados na resistência a antibióticos, dependendo da(s) espécie(s) envolvida(s). A presença da matriz que dificulta sua penetração e a diminuição da taxa metabólica são fatores inerentes aos biofilmes. Outra possível razão pode ser o aumento da proporção de células persistentes (Lewis, 2005). Apesar de geneticamente idênticas ao resto da população, essas células não se dividem e são resistentes a muitos antibióticos, possivelmente porque

expressam sistemas toxina-antitoxina onde o alvo dos antibióticos é bloqueado pela toxina (Lewis, 2005).

A formação de um biofilme é um processo que compreende pelo menos cinco etapas: adesão inicial, adesão irreversível, adesão célula a célula, maturação e dispersão. Na etapa inicial as células planctônicas podem mover-se ativamente ou serem levadas à superfície de adesão pelo fluxo de líquido. A adesão torna-se irreversível pela produção de matriz extracelular e/ou de adesinas específicas, que podem incluir *pili* ou fímbrias. A adesão célula a célula é importante na formação do biofilme propriamente dito e sua posterior maturação. Finalmente ocorre a dispersão de células que se destacam do biofilme e retornam ao estado planctônico (Van Houdt e Michiels, 2005).

A maturação de um biofilme corresponde ao seu crescimento tridimensional. Biofilmes maduros exibem um aspecto em forma de “cogumelos”, são formados por microcolônias e possuem canais de água em seu interior. Principalmente devido às interações célula a célula, este processo leva à formação de um ambiente físico no qual as bactérias exibem características fisiológicas que os distinguem de seus homólogos planctônicos (Beloin *et al.*, 2008).

Bactérias Gram-negativas respondem a estresse ambiental sintetizando fatores sigma alternativos. Em *E. coli*, esses fatores sigma estão sob o controle de Rpos ( $\sigma^S$ ), o regulador de resposta geral de estresse que compete com o fator sigma RpoD vegetativo ( $\sigma^{70}$ ) e outros fatores sigma. Biofilmes de cepas *rpos*<sup>+</sup> apresentam densidade mais elevada e um aumento do número de organismos viáveis (Adams e McLean, 1999); Rpos é ativado durante a fase de crescimento lento, sugerindo que as condições que provocam retardamento do crescimento bacteriano, tais como a limitação de nutrientes ou acúmulo de metabólitos tóxicos, favorecem a formação de biofilmes de *E. coli*. Por sua vez, limitação de nutrientes e aumento de concentrações tóxicas de metabólitos estão associados à alta densidade populacional que ocorre nos biofilmes. Quando as células de *E. coli* entram em fase estacionária, alternam da modalidade planctônica para uma potencialmente sésil expressando fímbrias curli. Esta transição é mediada por Rpos (Nguyen *et al.*, 2012). Entre os genes

sob o controle de Rpos, muitos são genes envolvidos na regulação inversa da motilidade e adesão mediada por curli, provavelmente através do mensageiro secundário c-di-GMP (Pesavento et al., 2008; Weber et al., 2006).

Fímbrias (ou fibras) curli são apêndices adesivos proteicos, de natureza amilóide, que permitem às células aderir umas às outras e a várias superfícies (Barnhart e Chapman, 2006). Além de curli, diversos componentes, como fímbrias, celulose, *pili* conjugativos e polissacarídeos podem fazer parte da matriz extracelular dos biofilmes de *E. coli*. Em bactérias crescidas em placas contendo o corante vermelho congo (*congo red*), a expressão simultânea de curli e celulose determina o morfotipo *rdar* (red, dry and rough). Esse morfotipo – identificado pelo aspecto das colônias em meio CRI - está associado, além da formação de biofilme, a outros comportamentos multicelulares, como agregação em líquido e formação de película na interface ar/líquido (Zogaj et al., 2003).

Em cepas de *E. coli* e *Salmonella*, a expressão de curli é favorecida por temperaturas abaixo dos 30°C. Entretanto, isolados clínicos, como cepas de *E. coli* isoladas de casos de septicemia, expressam curli a 37°C (Barnhart e Chapman, 2006). Vários estudos tem associado a expressão de curli à virulência em *Enterobacteriaceae*. Ela é considerada um fator importante para a colonização, já que é capaz de se ligar a moléculas de ampla distribuição no organismo, como a fibronectina (Olsén et al., 1989) e o MHC de classe I (Olsén et al., 1998). Em *E. coli* que causam infecções em aves (APEC), a ausência de curli reduz em cerca de 80% a capacidade de colonização do intestino (La Ragione et al., 2000). Cepas de *Salmonella enteritidis* deficientes na produção de curli tem seu crescimento reduzido em ovos (Cogan et al., 2004).

Além de ser um fator de colonização (Barnhart e Chapman, 2006), o fato de curli ser um amiloide leva ao estímulo da resposta inflamatória no hospedeiro (Bian et al., 2000; Tükel et al., 2009), a qual é mediada por TLR1/TLR2 (Tükel et al., 2009). A expressão de curli foi associada ainda ao aumento das taxas de invasão de células epiteliais por *Gophna et al.* (2001) e também por Uhlich et al. (2002) que relataram ainda aumento da virulência de EHEC expressando curli em modelo murino.

Biofilmes mistos, ou seja, formados por espécies diferentes, estão envolvidos em várias infecções de relevância clínica, tais como infecções orais (Periasamy e Kolenbrander, 2009), respiratórias (Murphy *et al.*, 2009; Eberl e Tümmler, 2004) e em usuários de cateteres (Douglas, 2003).

Em um trabalho recente, Uhlich *et al.* (2010) demonstraram que cepas EHEC, que normalmente não mostram habilidade de formar biofilme em monocultura, formavam biofilmes quando associadas a cepas não patogênicas de *E. coli*, o que pode estar associado à persistência dessas bactérias em superfícies.

Evidências de que biofilmes mistos podem estar diretamente envolvidos no estabelecimento de diarreia por *E. coli* vêm de trabalho recente realizado neste laboratório. Uma cepa de *Citrobacter freundii*, uma espécie considerada comensal e que, no entanto, foi isolada de uma criança com diarreia grave, mostrou ser capaz de intensificar a adesão de cepa patogênica de EAEC isolada do mesmo caso (Pereira *et al.*, 2010).

## 2- OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo geral

Comparar cepas DAEC Afa/Dr isoladas de crianças e de adultos, a partir da análise de características relacionadas à virulência e à formação de biofilmes em cepas isoladas de casos de diarreia e controles assintomáticos.

### 2.2 - Objetivos específicos

- Determinar a frequência de cepas de *Escherichia coli* de adesão difusa em casos de diarreia e em controles assintomáticos;
- Definir o perfil genético em relação às adesinas Afa/Dr portadas pelas cepas DAEC;
- Avaliar a presença e identificar possíveis novas adesinas da família Afa/Dr nas cepas DAEC;
- Determinar a frequência dos genes *sat*, *csgA*, *traA*, que codificam, respectivamente, a toxina SAT, a subunidade estrutural das fímbrias curli e pilina F, além dos genes *escJ* e *escV*, que fazem parte do TTSS;
- Caracterizar fenotipicamente as cepas DAEC em relação à motilidade, produção de celulose e fibras tipo curli;
- Determinar a capacidade de formação de biofilmes por cepas de *E. coli* de adesão difusa (DAEC), sozinhas ou em combinação com *C. freundii*;
- Verificar a capacidade de estimular a secreção de IL-8 em células HeLa;

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – Amostras bacterianas

Foram utilizadas amostras de *Escherichia coli*, pertencentes a duas coleções deste laboratório; a primeira consiste de amostras obtidas de crianças de até cinco anos de idade, que foram atendidas no Hospital Universitário de Brasília (HUB) e no Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB), no período de dezembro de 2000 a julho de 2002. Os casos de diarreia foram definidos como os que apresentaram um número aumentado de evacuações diárias com presença de fezes amolecidas (pastosas ou líquidas). Foram coletadas 127 amostras fecais de crianças com diarreia e 127 de crianças assintomáticas. Os controles foram definidos como aqueles que não apresentaram diarreia no período de quatro semanas antes da coleta. Indivíduos que tivessem feito uso de antibióticos 15 dias antes da coleta foram excluídos do estudo. Os controles foram pareados por idade e nível sócio-econômico e coletados no período de até 15 dias após a coleta do caso correspondente. Em geral, cinco isolados foram obtidos de cada amostra fecal, totalizando 1253 isolados. No momento da coleta, foram obtidos dados gerais sobre a saúde e alimentação das crianças.

A segunda coleção é composta por amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de 143 adultos com diarreia e 119 adultos assintomáticos, as quais foram previamente classificadas como DAEC e parcialmente caracterizadas (Piva, 1998; Almeida, 2003). A coleção consta de 27 cepas provenientes de adultos diarreicos e 15 cepas provenientes de adultos assintomáticos.

Todas as amostras foram submetidas à pesquisa dos sorogrupos de EPEC: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 and O158 (OMS, 1987). As cepas utilizadas como controle nos testes estão indicadas na tabela a seguir (tabela 2).

As amostras foram preservadas em ágar nutriente e criopreservadas em glicerol 20% a - 20°C.

Tabela 2 – Cepas bacterianas utilizadas como controle neste estudo

Cepa	Característica
<i>E. coli</i> C600	Controle negativo
<i>E. coli</i> KS 51	<i>operons afa/Dr e afaE-1</i>
<i>E. coli</i> A 22	<i>afaE-2</i>
<i>E. coli</i> A 30	<i>afaE-3</i>
<i>E. coli</i> AL 851	<i>afaE-5</i>
<i>E. coli</i> IH 11128	Fímbria Dr
<i>E. coli</i> C 1845	F1845/adesão difusa
<i>E. coli</i> 042	Biofilme/ adesão agregativa
<i>E. coli</i> 17.2	Biofilme/adesão agregativa
<i>E. coli</i> EPEC 8	<i>eae</i> /adesão localizada/TTSS
<i>C. freundii</i> - Cf 205	Biofilme
<i>Shigella flexneri</i> 46	Produção de IL-8



### 3.2- Critérios de definição de cepas DAEC

Foram selecionadas cepas de *Escherichia coli* que apresentaram resultado positivo, por PCR, para a presença da região conservada dos genes *afaB-C*, correspondente a um fragmento de 750 pb da região conservada dos operons *afa*, que codificam as adesinas Afa/Dr. Uma vez que cepas atípicas de EPEC (*E. coli* enteropatogênica) podem possuir essas adesinas, as amostras também foram testadas quanto à presença da região conservada do gene *eae*, que caracteriza as cepas EPEC; amostras positivas foram excluídas deste estudo. Os iniciadores utilizados estão listados na tabela 3.

As amostras Afa/Dr<sup>+</sup>/eae<sup>-</sup> foram submetidas aos testes de adesão em células cultivadas. Foram incluídas neste trabalho as amostras apresentando adesão difusa. Amostras causando descolamento celular também foram incluídas.

### 3.3- Critérios de exclusão

Foram excluídos da amostra os casos nos quais tenham sido isolados outros patógenos bacterianos, tais como *Salmonella sp.* e *Shigella sp.*, e cepas de *E. coli* pertencendo a outras categorias diarreiogênicas de *E. coli* (EPEC, EAEC, STEC/EHEC, ETEC e EIEC).

### 3.4- Identificação de adesinas Afa/Dr

Os genes *afaE-1*, *afaE-2*, *afaE-3/dre afaE-5* e *daaE*, que codificam, respectivamente, a porção estrutural das adesinas Afa-I, II, III/Dr, Afa-V e F1845 foram identificados por PCR. Os iniciadores estão listados na tabela 3. A diferenciação entre cepas que possuem Afa-III e Dr foi feita fenotipicamente através de testes de hemaglutinação manose-resistente em presença de cloranfenicol (Lè Bouguenec *et al.*, 1993).

### 3.5- Caracterização genética das cepas DAEC

A presença dos genes *afaB-C* que codificam as adesinas Afa/Dr, gene *sat*, que codifica a toxina Sat e genes *escV* e *escJ*, que fazem parte do sistema de secreção do tipo III, foi investigada por PCR. As condições empregadas para a PCR foram as seguintes: 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 30 ciclos na temperatura de anelamento de cada par de iniciadores por 1 minuto, e a 72°C por 1 minuto, seguidos de um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Todos os fragmentos utilizaram parâmetros semelhantes, exceto pela temperatura de anelamento. Os iniciadores estão listados na tabela 3.

Para extração do DNA, 1 mL de cultura foi centrifugada (3000g/3 min) e o precipitado ressuspense em 500 µL de água destilada. Essa suspensão foi colocada em banho-maria a 97°C e centrifugada novamente. O sobrenadante foi utilizado como fonte de DNA total para as reações de amplificação. Os produtos de amplificação foram resolvidos em géis de agarose 2%, em tampão acetato pH 8,2 (Anexo A, p 106).

As condições gerais para amplificação foram as seguintes:

10 mM Tris-HCl pH 8,8

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

50 mM KCl

200 µM cada dNTP

1 U Taq polimerase

10 µM cada iniciador

**Tabela 3 – Iniciadores utilizados neste trabalho**

Gene	Descrição	Sequência dos iniciadores	Tamanho do fragmento	Temperatura de anelamento	Referência
<i>afaB-C</i>	Região conservada dos operons <i>afa/dr</i>	5' GCTGGGCAGCAAAGTATACTCTC 3' 5' CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG 3'	750 pb	62°C	Le Bouguenec <i>et al.</i> , 1992
<i>afaE-1</i>	Adesina afimbrial Afa-I	5' CGAAAACGGCACTGACAAG 3' 5' AGGCTTCCGTGAATACAACC 3'	230 pb	61°C	Almeida, 2003
<i>afaE-2</i>	Adesina afimbrial Afa-II	5' TTAGACCGTACTGTTGTGTACC 3' 5' GTTCCCAGTAGACTGGAATGAAGC 3'	375 pb	48°C	Zhang <i>et al.</i> , 1997
<i>afaE-3/dre</i>	Adesina afimbrial Afa-III/hemaglutinina Dr	5' TTAGACCGTACTGTTGTGTACC 3' 5' ACCATTGTCGGTCGTCCAGGC 3'	408 pb	65°C	Le Bouguenec <i>et al.</i> , 1993
<i>afaE-5</i>	Adesina afimbrial Afa-V	5' TTAGACCGTACTGTTGTGTACC 3' 5' AGCATCGGCGCGGTATACGGT 3'	429 pb	48°C	Zhang <i>et al.</i> , 1997
<i>daaE</i>	Adesina fimbrial F1845	5' TGAAGTGTGACCGAAGAGTGC 3' 5' TTAGTTCGTCCAGTAACCC 3'	380 pb	48°C	Almeida, 2003
<i>sat</i>	Toxina SAT (autotransporter toxin)	5' GCAGCAAATATTGATATATCA 3' 5' GTTGTGACCTCAGCCAAGGAA 3'	630 pb	57°C	Taddei <i>et al.</i> , 2003
<i>escJ</i>	TTSS	5' GTCAATGTTGATGTCGTATCTAAG 3' 5' CACTAAGCTCGATATATAGAACCC 3'	826 pb	54°C	Kyaw <i>et al.</i> , 2003
<i>escV</i>	TTSS	5' GATGACATCATGAATAAACTC 3' 5' GCCTTCATATCTGGTAGAC 3'	2130 pb	54°C	Kyaw <i>et al.</i> , 2003
<i>traA</i>	Pilina F	5' AAGTGTTCAGGGTGCTTCTG 3'	385 pb	60°C	Pereira <i>et al.</i> , 2010

---

		5' TATTCTCGTCTCCCGACATC 3'			
<i>eae</i>	Intimina	5' CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC 3' 5' CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG 3'	881 pb	52°C	Oswald <i>et al.</i> , 2000
<i>csgA</i>	Curli	5' ACTCTGAACTTGACTATTACC 3' 5' AGATGCAGTCTGGTCAAC 3'	230 pb	53°C	Este estudo
<i>afaX</i>	Putativa adesina Afa/Dr (AfaX)	5' TTAGACCGTACTGTTGTGTACC 3' 5'CCGKYSAGGDTCAGDGTGTA 3'*	800 pb	58°C	Este estudo

---

\*K –T ou G; Y – T ou C; S- G ou C; D – A, T ou G.

### 3.6- Determinação da motilidade das cepas

A capacidade de motilidade das cepas DAEC foi determinada pelo padrão de crescimento em ágar semissólido (Anexo A, p. 101) em tubos verticais. As amostras bacterianas crescidas em LB (Anexo A, p. 100) foram inoculadas com auxílio de agulha bacteriológica, em profundidade de 1 cm a partir da superfície do meio. As amostras foram crescidas a 37°C por 24 horas e depois à temperatura ambiente por mais sete dias. Cepas que não mostraram motilidade neste período foram repicadas para novo meio. Foram consideradas negativas as cepas que não mostraram motilidade após três repiques (21 dias).

### 3.7- Ensaios de formação de biofilme

A formação de biofilme foi avaliada utilizando o método descrito por Wakimoto *et al.* (2004), que emprega placa de poliestireno contendo 96 poços, com modificações. Concisamente, 200 µL de DMEM-manose (Anexo A, p. 101) por poço foram inoculados com 5 µL de cada cultura bacteriana. As placas foram incubadas por 18 h a 37°C e os biofilmes formados foram corados com cristal violeta (Anexo A, p. 105) por 15 minutos e lavados com 200 µL/poço de PBS (Anexo A, p. 103). Os biofilmes foram quantificados utilizando a média do CV

adsorvido (OD 630 nm) no fundo do poço somado ao CV solubilizado por etanol (200 µL/poço). O resultado foi dado pela média de três experimentos independentes.

A cepa 205 de *Citrobacter freundii*, isolada de um surto de diarreia no Distrito Federal, foi utilizada como controle positivo. Esta cepa é capaz de formar, nas condições do teste, um biofilme de baixa intensidade, com presença de uma matriz que pode ser visualizada por microscopia ótica. Os valores das leituras (OD ± 0,2) desta cepa foram utilizados como ponto de corte. As cepas que tiveram leituras iguais ou maiores do que as de Cf 205 foram consideradas formadoras de biofilmes, enquanto aquelas que apresentaram leituras menores do que Cf 205 foram consideradas incapazes de formar biofilme. As cepas EAEC 042 e C600 foram utilizadas como controles internos dos testes (biofilmes intensos e controle negativo, respectivamente).

Para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), os biofilmes foram formados sobre lamínulas de vidro circulares com 13 mm de circunferência. Após 18 horas, as lamínulas foram lavadas com PBS para remover as bactérias não aderidas, e as bactérias foram deslocadas das lamínulas com 20 mL de PBS contendo 0,5 % de triton, por agitação. Cinco a dez microlitos de cada suspensão foram semeados em placas de ágar MacConkey e crescidos por 18 horas a 37°C, quando as UFC foram contadas. A diferenciação das cepas de *E. coli* e *C. freundii* foi feita com base na diferença de velocidade de fermentação de lactose por essas bactérias, (sendo a primeira um fermentador rápido e a segunda, lenta) que resulta em colônias de cores diferentes nas condições do ensaio. O resultado foi dado pela média de três experimentos independentes.

### **3.8- Manutenção de células HeLa**

As células foram mantidas em frascos com 25cm<sup>2</sup> de área, em meio DMEM (Anexo A, p. 101) contendo antibióticos (Anexo A, p. 101) e 5% de soro fetal bovino, a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingirem confluência

na superfície do frasco, as células foram repassadas para novos frascos ou placas para realização dos testes. Para deslocamento do tapete celular, as células eram lavadas três vezes com PBS glicosado (Anexo A, p. 102) contendo uma solução de tripsina/EDTA a 0,4% (Anexo A, p. 102). Após as lavagens, a solução foi parcialmente descartada e os frascos mantidos a 37°C por 10 minutos, após os quais os frascos foram agitados manualmente para permitir o descolamento das células. Estas foram homogeneizadas com 2ml do meio DMEM e distribuídas na proporção de 0,5ml a 1ml por novo frasco.

### **3.9- Ensaios de adesão**

Os ensaios de adesão em células de cultura foram realizados conforme previamente descrito, com adaptações (Scaletsky, 1984). Células HeLa (0,6 x 10<sup>5</sup> céls/orifício) cultivadas em DMEM (5% SFB e antibióticos) em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, em placas de 24 orifícios, montadas com lamínulas de vidro até atingir cerca de 5-70% de confluência foram infectadas com 50 µl de cultura bacteriana. Nos ensaios de adesão mista, foram utilizados 25 µl de cada cultura bacteriana. As bactérias foram incubadas por 3 horas, após as quais as células foram lavadas com PBS e as lamínulas fixadas com metanol, coradas com May-Grünwald e analisadas por microscopia ótica para determinar os níveis de adesão.

Para contagem das unidades formadoras de UFC, após os testes de adesão, os poços foram lavados seis vezes com PBS para remover as bactérias não aderidas, e as células foram lisadas com PBS contendo 0,5 % de triton. Dez microlitos de cada lisado, diluído 1:500 e 1:1000, foram semeados em placas de ágar MacConkey e crescidos por 18 horas a 37°C, quando as UFC foram contadas. A diferenciação das cepas de *E. coli* e *C. freundii* foi feita com base na diferença de velocidade de fermentação de lactose por essas bactérias, (sendo a primeira um fermentador rápido e a segunda, lenta) que resulta em colônias de cores diferentes nas condições do ensaio. O resultado foi dado pela média de três experimentos independentes.

### 3.10- Produção de curli e celulose

A produção de curli e celulose foram determinadas semeando as amostras de forma pontual em meio CRI (Anexo A, p. 100), de acordo com o descrito por Soloman *et al.*, 2005. As amostras foram divididas de acordo com os fenótipos descritos por Zogaj *et al.*, 2003: rdar (*red, dry and rough*), indicando produção de curli e celulose; bdar (*brown, dry and rough*), indicando produção apenas de curli; pdar (*pink, dry and rough*) indicando produção de celulose; e saw (*smooth and white*), indicando falta de produção de celulose e curli (Figura 4A).

A produção de celulose foi detectada visualizando a fluorescência das cepas crescidas em meio calcoflúor (Anexo A, p. 101), sob luz ultravioleta (Figura 4B) (Soloman *et al.*, 2005).

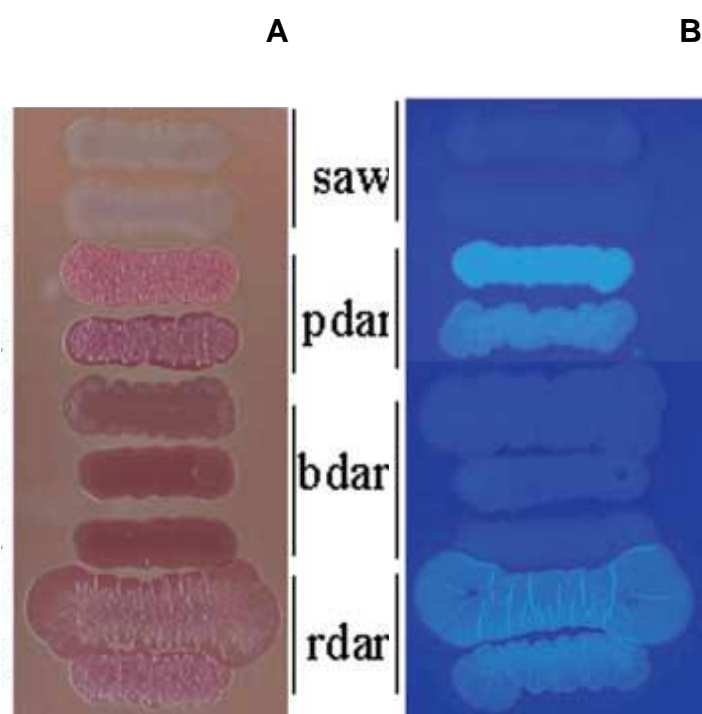


Figura 4: Aspecto de colônias bacterianas cultivadas nos meios CRI e calcoflúor. A produção de curli e celulose determinam os morfotipos saw, pdar, bdar e rdar em meio CRI (A). A produção de celulose pode ainda ser visualizada pela fluorescência das colônias em meio calcoflúor (B). Fonte: Bokranz *et al.*, 2005.

### **3.11- Extração de proteínas de superfície**

As colônias de DAEC crescidas até a confluência em LB Agar (Anexo A, p. 100) foram raspadas e ressuspensas em PBS. A extração das proteínas superficiais foi feita submetendo-se as suspensões à agitação intensa a 65°C seguida de centrifugação a 5000 RPM por 30 minutos para remoção dos restos celulares. As proteínas foram precipitadas com sulfato de amônio a 70%, ressuspensas em pequeno volume de PBS e submetidas à diálise para remoção do sal.

### **3.12 - Obtenção de anticorpo anti-AfaX**

Anticorpos policlonais foram obtidos, em camundongos “Swiss”, de acordo com metodologia padrão. Cada animal foi inoculado com 5 µg de proteína obtida conforme item anterior. A proteína diluída em um volume pequeno (25 µl) de PBS estéril foi inoculada via intramuscular na coxa do animal em 3 doses, com intervalos de 15 dias: a primeira, com adjuvante completo de Freund, a segunda com adjuvante incompleto e a terceira, apenas a proteína. Decorridos 15 dias após a última imunização os animais foram anestesiados com éter e exsanguinados através de incisão na veia subclávia. Todos os procedimentos com animais seguiram as normas recomendadas pelo CEUA e foram realizados somente após aprovação de projeto por este comitê.

### **3.13 - Ensaio de “Western blot”**

Após a eletroforese em SDS-PAGE das proteínas de superfície de *E. coli*, as bandas proteicas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi previamente incubada em solução de bloqueio (Anexo A, p. 102) contendo 1% de albumina sérica bovina por 18 horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada em TBS (Anexo A, p. 103), incubada com o anticorpo anti-AfaX diluído na proporção de 1:500 em solução de bloqueio e incubado por 18 horas com agitação branda. Após a incubação com o primeiro anticorpo, a



membrana foi lavada 3 vezes com TBS por 15 minutos cada. Em seguida procedeu-se a reação com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase, diluído na proporção de 1:1000 na solução de bloqueio. A incubação foi de 2 horas a temperatura ambiente sob agitação branda. A membrana foi novamente lavada com TBS e o complexo foi revelado com uma solução contendo partes iguais de BCPI (*5-bromo-4-cloro-indolyl phosphate*) e NBT (*nitro blue tetrazolium*).

### **3.14 - Contrastação negativa (Microscopia eletrônica de transmissão)**

As amostras bacterianas foram cultivadas em LB ágar (Anexo A, p. 100) por 18 horas a 37°C. Após o crescimento, uma quantidade da cultura bacteriana equivalente a uma única colônia foi ressuspensa em solução salina. Uma gota dessa solução foi aderida a uma tela de cobre com malha de 200 “mesh” recoberta com película de formvar (0,6%). O excesso de líquido foi removido com papel filtro e, na sequência, as telas foram depositadas em uma gota de solução de acetato de uranila a 0,1%. Após alguns minutos, as telas foram lavadas em água destilada, o excesso de líquido foi removido e as telas colocadas para secar. As telas foram visualizadas ao microscópio de transmissão Jeol, com corrente de 80kV, no laboratório de microscopia eletrônica da UnB.

### **3.15 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Para análise por MEV, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (5% de glutaraldeído mais 4% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M) por duas horas a temperatura ambiente ou por 18 horas em geladeira. Após, as amostras foram fixadas por uma hora em tampão cacodilato contendo 0,5% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrocianeto de potássio. Seguiu-se a desidratação em acetona (30-100%), secagem ao ponto crítico de CO<sub>2</sub> e deposição da camada de ouro (20nm) sobre as amostras. As amostras foram visualizadas no microscópio de varredura do laboratório de microscopia eletrônica da UnB.

### 3.16 – Sequenciamento

O sequenciamento dos genes foi realizado de forma automatizada pelo laboratório de Biologia Molecular da UnB, utilizando o equipamento MegaBACE 500 Plus (Molecular Dynamics) e pela empresa Ludwig Biotec, utilizando o equipamento ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### 3.17 – Bioinformática

A análise da sequência de *afa-X* e da proteína correspondente foi feita utilizando programas disponíveis publicamente, tais como:

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990), disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

ExpASy (Gasteiger *et al.*, 2003), disponível em: <http://web.expasy.org/translate/>

Os iniciadores foram desenhados com o auxílio dos programas BLAST (acima) e *Genfisher2* (Giegerich *et al.*, 1996), disponível em: <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/>

### 3.18 - Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o programa SPSS versão 13.0. Frequências foram analisadas por meio do teste de Fisher ou Qui-quadrado, quando indicado. Médias entre grupos foram comparadas por meio do teste t de Student. Resultados com valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Frequência de DAEC Afa/Dr

Um total de 1253 amostras de *E. coli*, isoladas das fezes de 127 casos de diarreia em crianças, e de 127 controles assintomáticos, foram examinadas quanto à presença de genes da região conservada dos *operons afa* (*afaB-C*), que codificam as adesinas da família Afa/Dr. Isolados positivos foram investigados quanto à presença da região conservada do gene *eae*, cuja presença é característica de EPEC. Cento e dezoito isolados tiveram resultado positivo para *afaB-C* e negativo para *eae*. Nos testes de adesão, a maioria das cepas (80,5% - 95/118) mostrou adesão difusa. Nove cepas (7,7%) foram não aderentes e uma (0,8%) aderiu num padrão indeterminado; estas cepas foram excluídas deste estudo. Apesar de outras 13 cepas (11%) terem causado descolamento celular, bactérias aderindo difusamente puderam ser observadas nas células remanescentes, e elas foram incluídos no estudo. Cento e oito cepas, sendo 50 de casos de diarreia e 58 de controles assintomáticos foram considerados DAEC Afa/Dr (tabela 4).

Em relação ao número de crianças estudadas, cepas DAEC Afa/Dr foram detectadas em de 21 dos 127 casos de diarreia (16,5%), e em 25 de 127 de indivíduos assintomáticos (19,6%). Não houve, portanto, diferença entre a frequência de DAEC em casos de diarreia em crianças e em seus controles. Cepas de DAEC Afa/Dr foram recuperadas de 27 dos 143 (18,8%) casos de diarreia em adultos, e de cinco dos 119 (4,2%) controles (Tabela 4). Conseqüentemente, cepas DAEC foram encontradas em maior frequência em casos de diarreia em adultos ( $P < 0.01$ ). Vinte e sete cepas foram obtidas de adultos com diarreia e quinze de adultos assintomáticos. (Tabela 4).

**Tabela 4 – Distribuição das cepas DAEC Afa/Dr isoladas de adultos e crianças**

<b>Grupo</b>	<b>Crianças</b>		<b>Adultos</b>		<b>Total</b>
	<b>Casos</b>	<b>Controle</b>	<b>Casos</b>	<b>Controle</b>	
Número de sujeitos de pesquisa	127	127	143	119	516
Portadores de DAEC Afa/Dr	21	25	27*	5*	78
% portadores de DAEC Afa/Dr	16,5%	19,6%	18,9%	4,2%	15,7%
Cepas DAEC Afa/Dr isoladas	50	58	27	15	150

\*(P<0.01)

## 4.2 - Adesinas Afa/Dr

Utilizando iniciadores específicos para o segmento “E” dos *operons afa*, os genes que codificam os diferentes tipos de adesinas da família Afa/Dr presentes na amostra foram identificados. Sua distribuição está mostrada na tabela 5.

Cepas isoladas de crianças e adultos exibiram perfis muito diferentes de adesinas Afa/Dr. Cepas isoladas de crianças mostraram maior diversidade, enquanto as cepas isoladas de adultos mostraram baixa variabilidade de genes *afaE* com distribuição distinta para as cepas de casos e controles.

Os genes *afaE-1*, *afaE2*, *afaE3/draE*, *afaE5* foram encontrados tanto em cepas de adultos como de crianças. O gene *afaE-1* foi o mais frequente e distribuiu-se de modo bastante uniforme em todos os grupos: crianças diarreicas, crianças assintomáticas, adultos diarreicos e controle. Os genes *afaE2*, *AfaE3/draE* também se distribuíram de modo semelhante, porém em frequências bem menores. Todas as cepas *afaE3/draE*<sup>+</sup> mostraram hemaglutinação resistente ao cloranfenicol, e portanto possuem Afa-III e não Dr.

O gene *afaE5* foi mais frequente em cepas de adultos, sendo detectado em frequência significativamente maior ( $P < 0,01$ ) nos controles assintomáticos (46,7% - 7/15) do que nos casos de diarreia (3,7% - 1/27).

O gene que codifica a adesina F1845 foi frequente em cepas isoladas de crianças, especialmente em cepas de controles (15,5% - 9/58). Esse gene não foi encontrado em cepas de adultos.

Associações entre mais de um tipo de adesinas Afa/Dr foram detectados em 12% (6/50) das cepas isoladas de crianças diarreicas, e em 29,3% (17/58) das cepas isoladas de crianças assintomáticas. Todas as combinações genéticas envolveram *afaE-1* ou *daaE*. A associação *afaE-1/afaE-2* foi encontrada apenas em casos de diarreia em crianças ( $P < 0,05$ ). Combinações de adesinas não foram encontradas em cepas de adultos.

Uma cepa positiva para *afaE-1/afaE-2*, escolhida aleatoriamente, teve as sequências de ambos os genes *afaE* parcialmente sequenciadas. A análise dessas sequências mostrou que um dos segmentos possui 98% de identidade com *afaE-1* e o outro mostrou 100% de identidade com *afaE-2* (Anexos B e C).

Em 20% (30/150) das cepas *afaB-C* positivas, o gene da adesina específica não pode ser identificado. Cepas com gene *afaE* indeterminado foram denominadas "*afa-X*". Cepas com *afaE* indeterminado foram encontradas em ambas as coleções, de crianças e adultos. Nas cepas de adultos, *afa-X* foi encontrado em 40,7% das cepas de diarreia, não sendo detectado em cepas de controles, portanto significativamente associado à diarreia em adultos ( $P < 0,01$ ).

**Tabela 5 – Distribuição dos genes das adesinas Afa/Dr em cepas DAEC isoladas de casos de diarreia e de controles assintomáticos**

Gene <i>afaE</i>	Número (%) de cepas isoladas de					
	Crianças			Adultos		
	Diarreia (N = 50)	Controle (N = 58)	Total (N = 108)	Diarreia (N = 27)	Controle (N = 15)	Total (N = 42)
<i>afaE-1</i>	22 (44)	19 (32,8)	41 (38)	12 (44,4)	5 (33,3)	17 (40,5)
<i>afaE-2</i>	5 (10)	3 (5,2)	8 (7,4)	1 (3,7)	2 (13,3)	3(7,1)
<i>afaE-3/draE</i>	1 (2)	1 (1,7)	2 (1,8)	2 (7,4)	1 (6,7)	3 (7,1)
<i>afaE-5</i>	1 (2)	2 (3,5)	3 (2,8)	1 (3,7) <sup>a</sup>	7 (46,7) <sup>a</sup>	8 (19)
<i>afa-X</i>	12 (24)	7 (12)	19 (17,6)	11 (40,7) <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	11 (40,7)
<i>daaE</i>	3 (6)	9 (15,5)	12 (11)	0	0	0
<i>afaE-1 + 2</i>	5 (10) <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	5 (4,6)	0	0	0
<i>afaE-1+ 3</i>	0	1 (1,7)	1 (0,9)	0	0	0
<i>afaE-1 + 5</i>	0	6 (10,3)	6 (5,1)	0	0	0
<i>afaE-1+ daaE</i>	1 (2)	5 (8,6)	6 (5,1)	0	0	0
<i>afaE-1 + 2 + daaE</i>	0	1 (1,7)	1 (0,9)	0	0	0
<i>afaE-2 + daaE</i>	0	2 (3,5)	2 (1,8)	0	0	0
<i>afaE-5 + daaE</i>	0	2 (3,5)	2 (1,8)	0	0	0

a,b,c - P<0.05 (casos x controle)

### 4.3- Caracterização de Afa-X

A sequência genética da adesina Afa-X foi amplificada por PCR com o uso de um par de iniciadores do qual um era parcialmente degenerado (tabela 3). Embora a degeneração tenha limitado o sequenciamento a uma das fitas, foram sequenciadas 783 bases, um fragmento maior do que o esperado para o gene de interesse. O uso do programa *blastn* indicou que parte da sequência possui 95% de identidade (315/332 pb) com a sequência de “*drbE121*”, uma adesina Afa/Dr identificada por Zhang *et al.* (1997) (Figura 5). A sequência mostrou semelhanças também com sequências de genes que codificam outras adesinas Afa/Dr (Anexo D).

A sequência de *afa-X* mostrou três possíveis quadros abertos de leitura (open reading frames). O uso do programa *blastx* mostrou que a sequência da proteína deduzida a partir de um destes quadros de leitura é semelhante com as sequências de adesinas Afa/Dr (Anexo E). A maior proximidade foi encontrada para DrbE-121 (86% de identidade). A análise revelou ainda a presença de um domínio conservado (domínio de ligação ao receptor) que é compartilhado pelas adesinas DrbE-121, Dr, Afa-I, Afa-III, DrbE-122 e Afa-V; todas pertencentes à família Afa/Dr (Anexo F). Paralelamente, as proteínas de superfície de cepas Afa-X e de cepas padrão de DAEC foram submetidas à eletroforese. Todas as cepas de adultos diarreicos apresentaram uma proteína de superfície de aproximadamente 11 kDa, um tamanho comparável ao das adesinas Afa/Dr conhecidas (Le Bouguenec *et al.*, 1993; Swanson *et al.*, 1991; Labigne-Roussel *et al.*, 1984) (Figura 6A). O “western blot” mostrou que o anticorpo anti-Afa-X foi capaz de reagir tanto com Afa-X como com proteínas de superfície de cepas padrão portando as adesinas Afa-I, Afa-II, Afa-III e adesina Dr, confirmando que as cepas “Afa-X” portam proteínas de superfície relacionadas às adesinas Afa/Dr. Não foi verificada reação cruzada com material proveniente de cepas positivas para F1845 (Figura 6B).



```

Afa-X 180
GCACATAAACGACATACCGAATTGCACGACCGGGCGGTTCTGGGAGAAGTCTCCGTCAGT 239
      ||| |||||
|||||
drbE121 145
GCAAATAAACGACAGAGCGAATTGCACGACCGGGCGGTTCTGGGAGAAGTCTCCGTCAGT 204

afa-X 240
GGGGTGGGTTGCGGTACCGACCAGCGCGTGCCGGTGAGTGCGGGTAATTTTTATGACGGA 299
      |||||
|||||
drbE121 205
GGGGTGGGTTGCGGTACCGACCAGCGCGTGCCGGTGAGTGCGGGTAATTTTTATGACGGA 264

afa-X 300
ACCTTTGGCTTTTTTATGACCCAAGACGGCGGGACATAAAAACTGACCGCCACCTAGCC 359
      ||| |||||
|||||
drbE-121 265
ACCAATGGCTTTTTTATGACCCAAGACGGCGGGACAGAAAACTGACCGTCGACCTAGCC 324

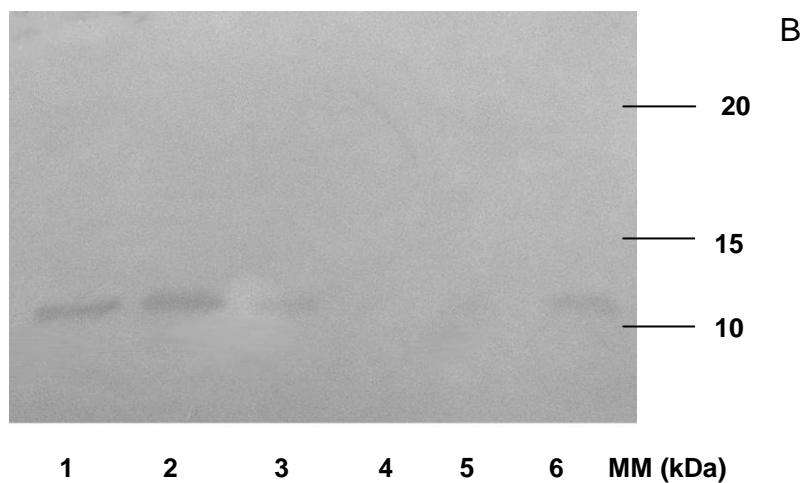
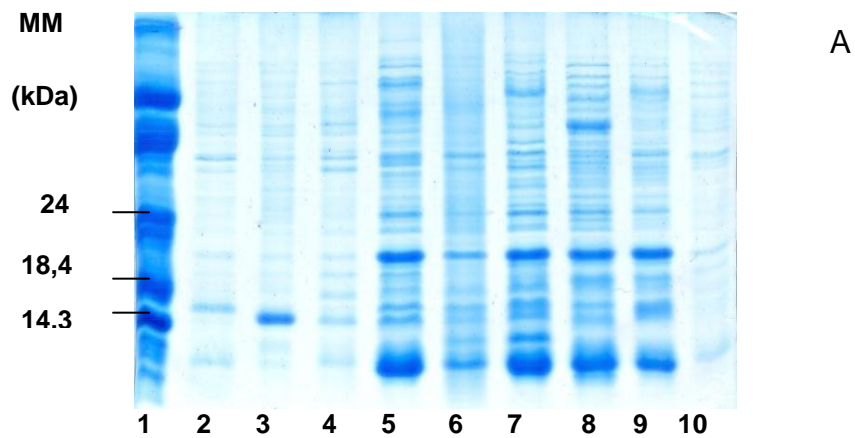
afa-X 360
ACTAATGGCGACCAATGGAAAAAGGATAACGGCGTGTATTACCGCGCCGCCGGTGGGGAC 419
      |||||
drbE-121 325
ACTAATGGCGACCAATGGAAAAAGGATAACGGCGTGTATTACCGCGCCGCCGGTGGGGAC 384

afa-X 420
TGGACTGTATAGATCGCTATTATTGTACGGGGAGAACAGGTGAACAAACCGACCGGTAAA 479
      ||||| |||||
|||||
drbE-121 385
TGGACTGGAAAGATCGGTATTATTGTACGGGGAGAACAGGTGAACAAACCGACCGGTAAA 444

afa-X 480 TACACCATGCACCCAGATGT-GGTTTCTGGGC 510
      ||||| ||| ||||| ||| |||||
drbE-121 445 TACACCATGAACCTAGATGGCGGCTACTGGGC 476

```

**Figura 5- Alinhamento entre a sequência de *afa-X* e a sequência de *drbE121*. O programa blastn mostrou 95% de identidade entre as duas sequências.**



**Figura 6 – Análise da proteína Afa-X. A: Eletroforese de proteínas de superfície de cepas portando adesinas Afa/Dr em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). Amostras: 1: Marcador de massa molecular (MM); 2 - Afa-I; 3 - F1845; 4 - Afa-III; 5 a 10 – AfaX. B: “western blot” de proteínas de superfície utilizando anticorpo anti-afaX. Amostras: 1: Afa-X - amostra utilizada na preparação do anticorpo; 2: Afa-X - outra cepa de adulto diarreico; 3: AL851 (Afa-V); 4: C1845 (F1845); 5: C600; 6: A 30 (Afa-III); Marcador de massa molecular (MM).**

#### 4.4 - Distribuição de características associadas à virulência

As cepas DAEC Afa/Dr foram examinadas em relação a características possivelmente associadas à virulência. O resultado está sumarizado na tabela 6.

O gene que codifica a toxina SAT foi frequente em cepas de adultos, tanto diarreicos (66,7% -18/27) como assintomáticos (86,6% -13/15). Em contrapartida, em cepas de crianças, o gene *sat* foi encontrado em maior frequência ( $P<0,05$ ) em casos de diarreia (46%- 23/50) do que em controles (18,9% -11/58), apontando a importância de SAT nas diarreias infantis induzidas por DAEC.

A presença dos genes *escV* e *escJ*, que são parte do Sistema de Secreção do Tipo Três (TTSS), foi investigada nas cepas DAEC Afa/Dr. Em cepas de adultos, esses genes foram detectados em apenas uma cepa, isolada de um caso de diarreia (3,7% - 1/27). Surpreendentemente, 51,7% (30/58) das cepas isoladas de crianças assintomáticas foram positivas para *escV* ou *escJ*; esses genes foram encontrados em apenas 6% (3/50) das cepas de crianças diarreicas ( $P<0,05$ ).

A motilidade das cepas DAEC foi determinada em meio ágar semissólido. A maioria das amostras (88,6% - 130/150) mostrou motilidade, independente da origem.

Entre as cepas testadas para secreção de IL-8, 53,4% (31/58) das cepas controle e 28% (14/50) das cepas de diarreia em crianças foram capazes de estimular a secreção desta citocina por células HeLa ( $P<0,01$ ). Com relação às cepas de adultos, 26,6% (4/15) das cepas isoladas de controles assintomáticos estimularam secreção de IL-8. Todas as cepas de adultos que estimularam secreção de IL-8 eram de um mesmo caso e provavelmente representam um clone. Cepas de adultos diarreicos capazes de estimular produção de IL-8 não foram detectadas.

O nível médio de secreção de IL-8 por células estimuladas por cepas DAEC foi 60 pg/mL, atingindo o máximo de 350 pg/mL. A maioria das cepas, tanto de adultos (4/4 – 100%) como de crianças (33/43 – 73,3%) mostrou níveis baixos de secreção de IL-8 (até 100 pg/mL). Secreção de IL-8 não foi detectada em células HeLa não infectadas nem em células infectadas com *E. coli* C600.

A capacidade de estimular secreção de IL-8 em células HeLa não foi associada a motilidade, tipo de adesina Afa/Dr ou qualquer outra característica examinada neste estudo.

**Tabela 6 – Características associadas à virulência em cepas DAEC Afa/Dr isoladas de crianças e adultos**

Característica	N (%) de cepas isoladas de:			
	Crianças		Adultos	
	Diarreia	Controle	Diarreia	Controle
<i>sat</i>	23 (46) <sup>a</sup>	11 (18,9) <sup>a</sup>	18 (66,7)	13 (86,6)
<b>Motilidade</b>	45 (90)	55 (94,8)	19 (70,3)	14 (93,3)
<b>TTSS</b>	3 (6) <sup>b</sup>	30 (51,7) <sup>b</sup>	1 (3,7)	0
<b>Secreção de IL-8</b>	14 (28) <sup>c</sup>	31 (53,4) <sup>c</sup>	0 <sup>d</sup>	4 (26,6) <sup>d</sup>
<b>Total</b>	50	58	27	15

<sup>a,b,c,d</sup> P<0.05 (casos x controles)

**TTSS:** presença dos genes *escJ* e/ou *escV*

***sat*:** gene da toxina SAT (*secreted autotransporter toxin*)

#### 4.5 - Componentes dos biofilmes

Alguns dos componentes da matriz dos biofilmes de *E. coli* foram investigados e o resultado está indicado na tabela 7.

Uma vez que *pili* conjugativos podem ter papel no estabelecimento dos biofilmes de *E. coli*, foram realizados ensaios de PCR para detecção do gene *traA*, que codifica pilina, unidade estrutural dos *pili* F. Cepas *traA* positivas foram detectadas em alta frequência em todos os grupos estudados.

A expressão de curli e celulose podem ser determinadas pelos morfotipos exibidos em meio CRI (*congo red indicator*); Alternativamente, a produção de celulose pode ser visualizada em meio contendo o corante calcoflúor. As cepas DAEC foram testadas nesses dois meios, sendo crescidas à temperatura de 37°C, para simular as condições no hospedeiro humano.

Quando as bactérias foram cultivadas no meio CRI, cinco fenótipos foram observados. Além dos quatro morfotipos descritos na literatura, muitas exibiram uma coloração alaranjada (tabela 8). Essas amostras foram todas negativas para produção de celulose em meio contendo calcoflúor. Estudos de microscopia eletrônica de transmissão foram realizados com duas cepas de cada morfotipo e confirmaram os resultados obtidos em meio CRI. As cepas de coloração alaranjada mostraram estruturas de superfície compatíveis com curli (Figura 7). Assim, essas amostras foram consideradas positivas para curli e negativas para celulose.

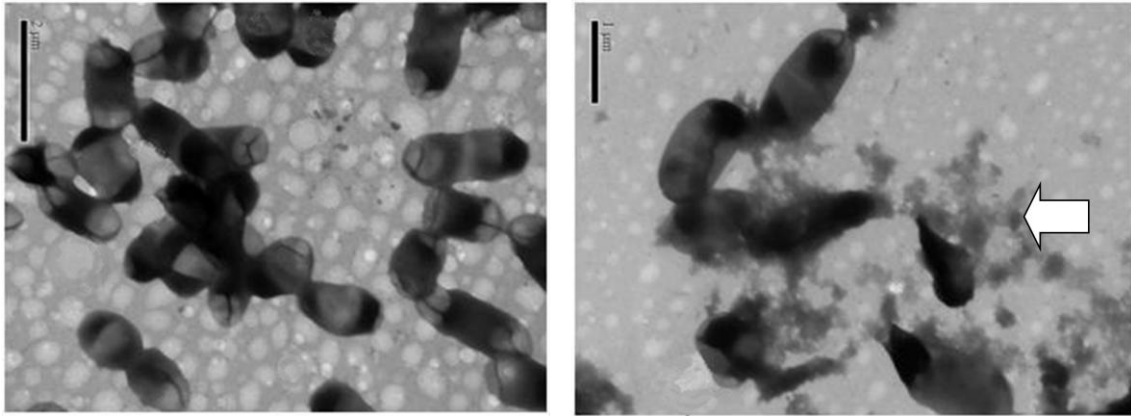
A frequência de curli foi dada pela soma de todos os morfotipos associados à produção de curli – rdar, bdar e o de coloração alaranjada. Considerados isoladamente, a frequência dos morfotipos não diferiu em casos e controles (tabela 8).

Cepas positivas para curli foram detectadas em frequências similares em casos de diarreia em crianças (62% - 31/50) e em controles (67,2% - 39/58). Em contraste, em cepas de adultos a expressão de curli foi maior ( $P < 0,05$ ) em cepas de casos de diarreia (59,2% - 16/27) do que nos controles (6,7% - 1/15).

As cepas também foram cultivadas em meio CRI a 28°C. Cinco cepas isoladas de adultos, quatro de casos de diarreia (14,8% - 4/27) e uma (6,7% - 1/15) de controles assintomáticos, foram positivas para produção de curli. Entre os isolados de crianças, 36% (18/50) das cepas de casos de diarreia e 37,9% (22/58) dos controles foram positivos para curli a 28°C. Portanto, entre as cepas DAEC Afa/Dr, mais cepas expressaram curli a 37°C do que a 28°C. A maioria das cepas que exibiram uma coloração alaranjada a 37°C exibiu o morfotipo *saw* (ausência de curli ou celulose) quando crescida a 28°C. Juntos, esses resultados sugerem que a expressão de curli por cepas DAEC é favorecida a 37°C.

A maioria das cepas (92% - 138/150) foi positiva para o gene *csgA*. O gene, que codifica a subunidade estrutural principal de curli, foi encontrado em alta frequência em todos os grupos (tabela 7). No entanto, a expressão de curli foi variável: algumas cepas foram positivas nos testes fenotípicos apenas a 37°C, apenas a 28°C, em ambas as temperaturas e outras ainda, apesar de positivas para *csgA*, não expressaram curli.

Algumas cepas foram positivas para expressão de celulose em calcoflúor e negativas em meio CRI, ou vice-versa. Os resultados sobre produção de celulose apresentados na tabela 7 indicam os resultados obtidos em meio calcoflúor. Apenas uma cepa isolada de adultos (de um caso de diarreia) foi positiva para produção de celulose em meio calcofluor. Em cepas de crianças, a frequência de produção de celulose foi maior ( $P < 0,05$ ) entre cepas isoladas de controles (29,3% - 17/58) do que nas isoladas de casos de diarreia (10% - 5/50).



**Figura 7 – Microscopia eletrônica de transmissão (contrastação negativa). Micrografias de cepa com morfotipo saw (curli negativo) (A) e de cepa com coloração alaranjada em meio CRI (B) mostrando estruturas compatíveis com fímbrias do tipo curli (seta). (Aumentos: A: 15000 vezes; B: 20000 vezes).**



**Tabela 7 – Componentes da matriz de biofilmes detectados em cepas de adultos e crianças**

Característica	Número (%) de cepas isoladas de:			
	Crianças		Adultos	
	Diarreia	Controle	Diarreia	Controle
<i>traA</i>	45 (90)	47 (81)	19 (70,3)	13 (86,6)
<i>csgA</i>	49 (98)	55 (94,8)	20 (74)	14 (93,3)
Curli a 37°C	31 (62)	39 (67,2)	16 (59,2) <sup>a</sup>	1 (6,7) <sup>a</sup>
Curli a 28°C	18 (36)	22 (37,9)	4 (14,8)	1 (6,7)
Celulose	5 (10) <sup>b</sup>	17 (29,3) <sup>b</sup>	1 (3,7)	0
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>58</b>	<b>27</b>	<b>15</b>

<sup>a,b</sup> P<0.05 (casos x controles)

*traA*: gene da unidade estrutural de *pili F*

*csgA*: gene da unidade estrutural de curli

**Tabela 8 – Morfotipos exibidos por cepas DAEC Afa/Dr em meio CRI a 37°C**

			N (%) de cepas isoladas de:					
Morfotipo	Coloração da colônia	Produção de:	Crianças			Adultos		
			Diarreia	Controle	Total	Diarreia	Controle	Total
<b>rdar</b>	Vermelha	celulose <sup>+</sup> /curli <sup>+</sup>	8 (16)	22 (37,9)	30 (27,8)	6 (22,2)	0	6 (14,3)
<b>bdar</b>	Marrom	celulose <sup>-</sup> /curli <sup>+</sup>	12 (24)	8 (13,8)	20 (18,5)	4 (14,8)	0	4 (9,5)
<b>pdar</b>	Cor-de-rosa	celulose <sup>+</sup> /curli <sup>-</sup>	4 (8)	2 (3,5)	6 (5,6)	0	0	0
<b>saw</b>	Branca	celulose <sup>-</sup> /curli <sup>-</sup>	15 (30)	17 (29,3)	32 (29,6)	9 (33,3)	15 (100)	26 (61,9)
	Alaranjada	celulose <sup>-</sup> /curli <sup>+</sup> *	11 (22)	9 (15,5)	20 (18,5)	8 (29,6)	0	8 (19)
<b>Total</b>			50	58	108	27	15	42

\*provável

#### **4.6 - Associação entre curli e *afaE***

Nas cepas de adultos, foi observada uma relação entre alguns tipos de gene *afaE* e a expressão de curli a 37°C (tabela 9). Cepas positivas ao mesmo tempo para expressão de curli e *afa-X* foram encontradas somente em casos de diarreia, e representam 25,9% dessas cepas (7/27). Cepas positivas para *afaE-5* e negativas para curli foram encontradas somente em controles assintomáticos. Essas cepas correspondem a 46,6% (7/15) das cepas isoladas de adultos assintomáticos. Esse tipo de associação não foi observada para as cepas de crianças, que mostraram grande diversidade de adesinas Afa/Dr.

#### **4.7 - Sorogrupos clássicos de EPEC**

As cepas DAEC Afa/Dr foram submetidas à pesquisa de sorogrupos clássicos de EPEC. Eles foram detectados em 30,5% (33/108) das cepas isoladas de criança. Os sorogrupos O86, O158, O142 e O127 foram identificados. O sorogrupo O86 foi o mais frequente, tanto em casos de diarreia como em controles (Tabela 10). Cepas com sorogrupos de EPEC e as demais cepas mostraram perfis similares em relação às demais características pesquisadas neste estudo.

Sorogrupos clássicos de EPEC não foram detectados em cepas isoladas de adultos.

**Tabela 9 – Associação entre curli e *afaE* em cepas de adultos**

<b>Número (%) de cepas expressando curli em:</b>						
<b>Tipo <i>afaE</i></b>	<b>Casos de diarreia</b>			<b>Controles assintomáticos</b>		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
<b>1</b>	6 (50)	6 (50)	12	0	5 (100)	5
<b>2</b>	1 (100)	0	1	0	2 (100)	2
<b>3</b>	2 (100)	0	2	1 (100)	0	1
<b>5</b>	0	1 (100)	1	0	7 (100)	7
<b>X</b>	7 (63,6)	4 (36,4)	11	0	0	0
<b>Total</b>	16	11	27	1	14	15

**Tabela 10 – Sorogrupos clássicos de EPEC em cepas isoladas de crianças**

<b>Sorogrupos</b>	<b>Número (%) de cepas apresentando</b>					<b>Total</b>
	<b>O86</b>	<b>O127</b>	<b>O142</b>	<b>O158</b>	<b>Outros</b>	
<b>Diarreia</b>	13 (26)	0	1 (2)	5 (10)	31 (62)	50
<b>Controle</b>	7 (12,1)	2 (3,4)	0	5 (8,6)	44 (75,9)	58
<b>Total</b>	20	2	1	10	75	108

#### 4.8 - Formação de biofilme

A capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica por cepas DAEC foi avaliada comparando-se os valores de absorvância dos biofilmes formados aos de cepas padrão que formam ou não biofilmes. A cepa 205 de *Citrobacter freundii* (Cf 205), isolada de um caso de diarreia no Distrito Federal, foi utilizada nos ensaios de biofilme misto e forma biofilmes de baixa intensidade, aqui considerados como nível mínimo de formação de biofilme.

Nos ensaios realizados com DAEC isoladas de crianças, 96 cepas (88,9%), quando em cultura pura, mostraram níveis de adsorção inferiores aos da cepa Cf 205. Essas cepas foram consideradas incapazes de formar biofilme nas condições estudadas. As cepas restantes, (11% - 12/108) formaram biofilmes de baixa intensidade (comparáveis aos de *C. freundii*) (Figura 8 A). A frequência de cepas de crianças capazes de formar biofilmes foi maior ( $P < 0,01$ ) entre os controles (18% - 11/58) do que entre casos de diarreia (2% - 1/50).

Testes realizados com cepas DAEC isoladas de adultos mostraram que 73,8% (31/42) não formaram biofilmes. Onze cepas (26,2% - 11/42) formaram biofilmes, sendo um deles (2,4% - 1/42), intenso (Figura 8C). A frequência de formação de biofilmes não diferiu entre casos (25,9% - 7/27) e controles (26,6% - 4/15).

A frequência de cepas DAEC capazes de formar biofilmes foi maior ( $P < 0,05$ ) entre cepas isoladas de adultos (26,2% - 11/42) que de crianças (10,2% - 12/118).

#### 4.9 - Biofilmes mistos

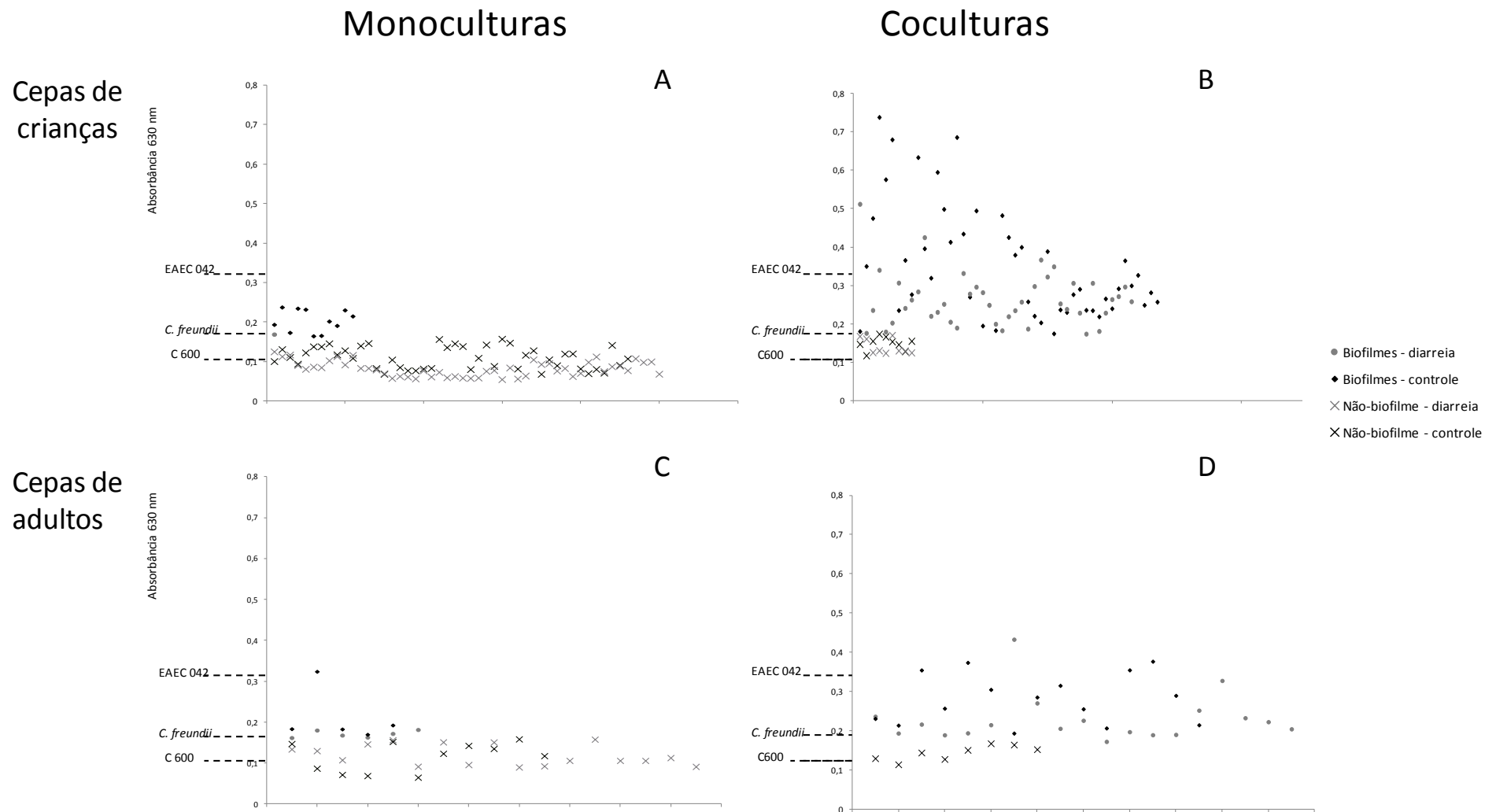
Com o intuito de avaliar o efeito de combinações bacterianas na formação de biofilmes, ensaios de biofilmes mistos foram realizados usando

coculturas de cepas DAEC e a cepa Cf 205 de *C. freundii* (que forma biofilmes fracos em monocultura). Formação de biofilmes mistos foi observada em 83% (90/108) dos consórcios envolvendo cepas de crianças enquanto 16,6% (18/108) não formaram biofilmes (Figura 8B). Em 23,1% (25/108) dos consórcios foram formados biofilmes intensos (iguais ou mais intensos que os da cepa 042 de EAEC), indicando um efeito sinérgico da interação DAEC- *C. freundii*. Biofilmes mistos de modo geral foram detectados tanto em cepas de casos de diarreia (82% - 41/50) como de controles (84,5% - 49/58). Entretanto, a frequência de biofilmes intensos foi maior ( $P < 0,05$ ) entre as cepas isoladas de controles assintomáticos (34,5% - 20/58) do que entre as isoladas de casos de diarreia (10% - 5/50).

Em 80,9% (34/42) dos consórcios envolvendo cepas de adultos foi observada formação de biofilmes. Em 11,9% (5/42) dos consórcios foram formados biofilmes intensos (Figura 8D). Analisando a frequência geral de formação de biofilmes de cepas de adultos, não foi encontrada diferença significativa entre cepas isoladas de casos (81,5% - 22/27) ou controles (80% - 12/15), independente da intensidade do biofilme.

A capacidade de formar biofilmes mistos não foi associada à presença de nenhuma das características avaliadas para DAEC, tais como adesinas Afa/Dr, TTSS, motilidade, curli ou celulose.

Para determinar o aumento relativo na intensidade dos biofilmes, a densidade ótica (OD) observada para cada cocultura DAEC - *C. freundii* foi comparada à OD da respectiva cepa DAEC em monocultura. O efeito da associação com *C. freundii* foi mais pronunciado para cepas DAEC isoladas de crianças. Mais da metade (53%) das coculturas com cepas de adultos mostraram aumentos de até 100%. Já para a maioria (75%) das amostras de crianças, os aumentos foram maiores do que 100% (Figura 9). O aumento máximo observado para as cepas de adultos foi de três vezes, enquanto em cepas de crianças atingiu seis vezes.



**Figura 8 – Formação de biofilmes simples e mistos por cepas DAEC Afa/Dr. Cepas DAEC Afa/Dr de crianças (A) e adultos (C) em monocultura geralmente mostram valores de absorbância baixos, próximos aos do controle negativo (C600), enquanto os consórcios DAEC – *C. freundii* (B e D) mostram absorbância aumentada.**



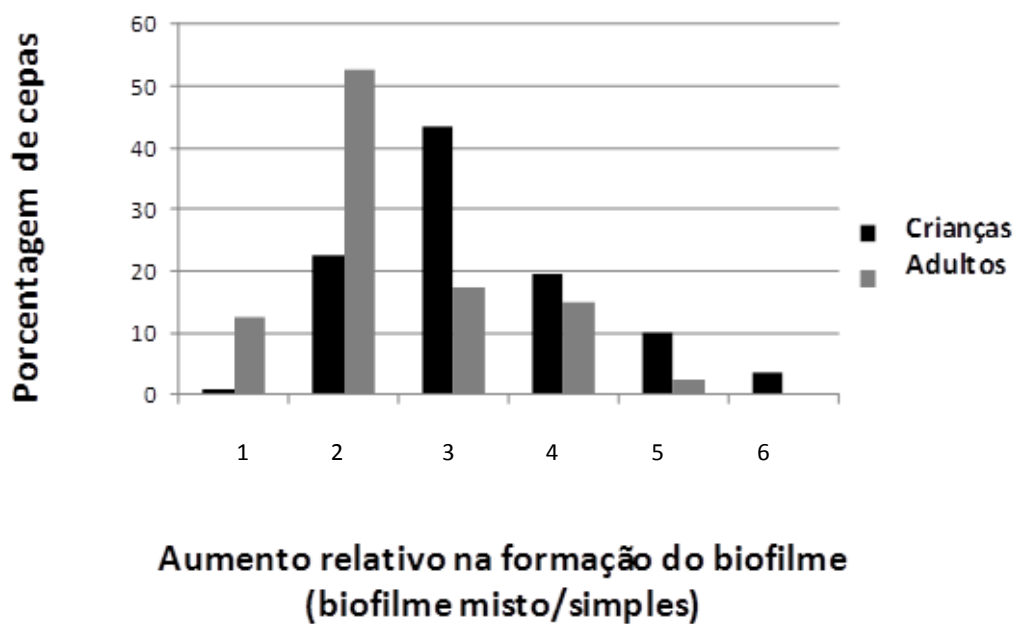


Figura 9 – Aumento relativo na formação de biofilmes mistos. O incremento na formação de biofilme, quando em cocultura é maior nas cepas de crianças do que nas cepas de adultos. 1: cepas que não apresentaram aumento; 2: aumento de até 1 vez ; 3: aumento de até 2 vezes; 4: aumento de até 3 vezes; 5: aumento de até 4 vezes; 6: aumento superior a 5 vezes.

#### 4.10 - Adesão a células HeLa

Para avaliar se o aumento na formação de biofilmes mistos estava associado ao aumento da adesão a células epiteliais, foram realizados ensaios de adesão utilizando coculturas de cepas DAEC e da cepa Cf 205 de *C. freundii* que haviam mostrado biofilmes aumentados.

A microscopia ótica mostrou que, nos consórcios, o número de bactérias aderidas às células era maior do que o encontrado para cada uma das cepas separadamente. O padrão de adesão produzido mostrou-se semelhante ao agregativo, porém com uma maior proporção de bactérias aderidas (Figura 10).

Entre os consórcios DAEC – Cf 205 que mostraram adesão aumentada a células, três, escolhidos aleatoriamente, foram utilizados para a realização de testes de adesão em células HeLa seguidos da contagem média de unidades formadoras de colônias (UFC). Não foi observada inibição de crescimento das cepas utilizadas nos ensaios, quando em cocultura (dados não mostrados). Os testes mostraram que o cocultivo aumenta o número de bactérias aderidas às células. Contudo, o número de bactérias recuperadas, bem como a relação DAEC/*C. freundii* variou nos consórcios analisados. Em dois casos, o número de UFC de ambas as espécies não diferiu significativamente (DAEC 1 e DAEC 2) e no terceiro, a média de UFC de *C. freundii* foi maior (figura 11). Todavia, em todos os casos, o número de UFC de cepas DAEC recuperadas das coculturas foi maior que nas monoculturas. O menor aumento registrado no número de bactérias aderidas foi de 3,2 vezes (DAEC 3) e o maior (DAEC 1), foi de 53 vezes.

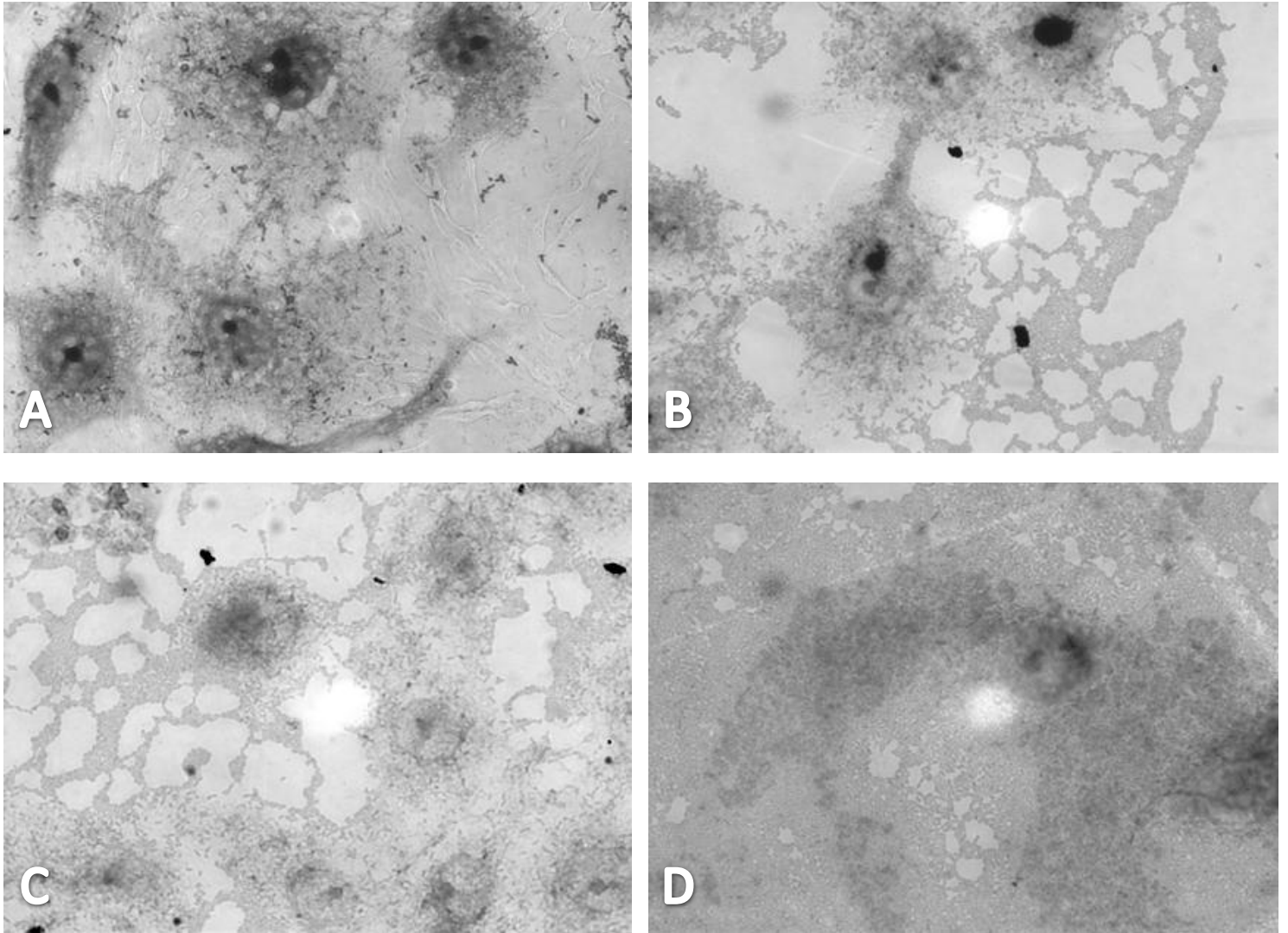
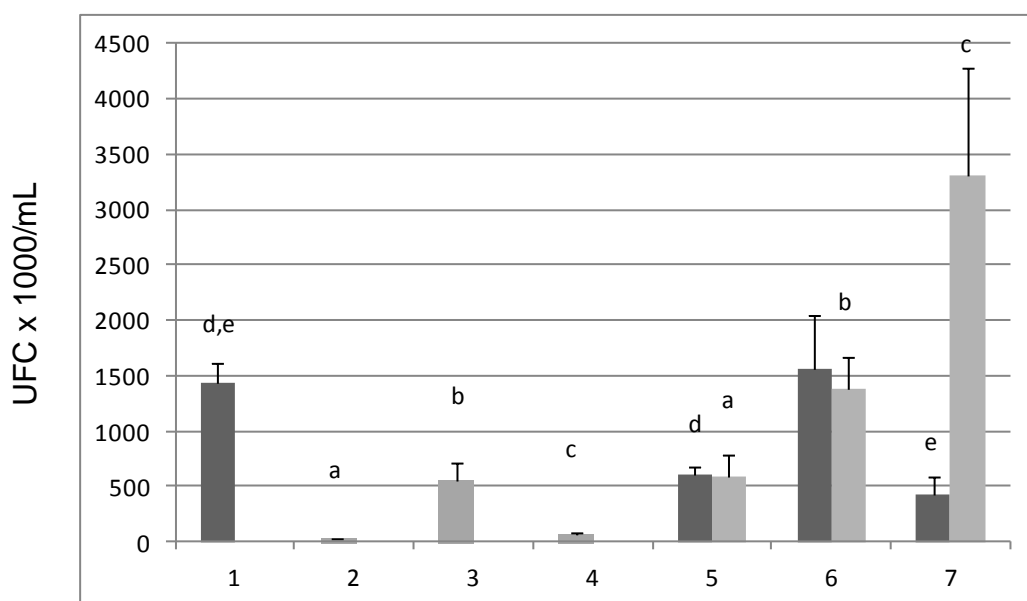


Figura 10 – Ensaio de adesão a células HeLa. A adesão após 3 horas de incubação é intensificada quando cepas DAEC e a cepa Cf 205 de *C. freundii* são inoculadas juntas. A: Adesão difusa típica de cepa DAEC (DAEC 1) em monocultura; B: *C. freundii* mostrando adesão agregativa; C e D: ensaios de adesão utilizando coculturas de *C. freundii*/DAEC 1 (C) e *C. freundii*/DAEC 3 (D). Aumento: 400 vezes.



**Figura 11 – Ensaio quantitativo de adesão sobre células HeLa. A contagem média de UFC recuperadas de monoculturas de DAEC ou *C. freundii* aderidas sobre células HeLa foi comparado à média de UFC de cada uma das bactérias, quando aderidas concomitantemente sobre as células. As barras escuras representam a contagem média de UFC de *C. freundii*, e as barras claras, de DAEC Afa/Dr. 1: *C. freundii*; 2: DAEC 1; 3: DAEC 2; 4: DAEC 3; 5 a 7 - ensaios de adesão mista. 5: *C. freundii*/DAEC 1; 6: *C. freundii*/DAEC 2; 7: *C. freundii*/DAEC 3. As letras indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na comparação entre os dois grupos.**

#### 4.11 - Inibição da formação de biofilmes por zinco

Os ensaios de biofilmes de cepas DAEC, sozinhas ou em associação com a cepa Cf 205 de *C. freundii*, foram realizados em presença de zinco em concentração suficiente para inibir *pili* conjugativos (F) sem afetar o crescimento bacteriano.

Inibição por zinco foi verificada em 39,1% (9/23) dos biofilmes simples e em 57,3% (71/124) dos biofilmes mistos (Tabela 11), sugerindo que *pili* F podem ter papel importante na formação de biofilmes de DAEC, especialmente quando em associação com *C. freundii*. Para verificar a participação de *pili* F, alguns biofilmes mistos que haviam mostrado inibição por zinco foram submetidos à microscopia eletrônica (para os ensaios de microscopia não foi adicionado zinco). A análise revelou *pili* únicos mediando a adesão célula-a-célula e também à superfície abiótica (Figura 12 A e C). A presença de matriz, mas não de *pili*, pôde ser observada em biofilmes não afetados por zinco (Figura 12 B e D).

**Tabela 11 – Inibição por zinco de biofilmes simples e mistos**

		<b>Crianças</b>		<b>Adultos</b>		<b>Total N(%)</b>
		<b>Casos N(%)</b>	<b>Controle N(%)</b>	<b>Casos N(%)</b>	<b>Controle N(%)</b>	
<b>Biofilmes simples</b>	Inibidos por Zn	0	4 (36,4)	5 (71,4)	0	9 (39,1)
	Não inibidos	1 (100)	7 (63,6)	2 (28,6)	4 (100)	14(60,9)
	Total	1	11	7	4	23
<b>Biofilmes mistos</b>	Inibidos por Zn	26 (63,4)	26 (53,1)	12 (54,5)	7 (58,3)	71 (57,3)
	Não inibidos	15 (36,6)	23 (46,9)	10 (45,5)	5 (41,7)	53 (42,7)
	Total	41	49	22	12	124

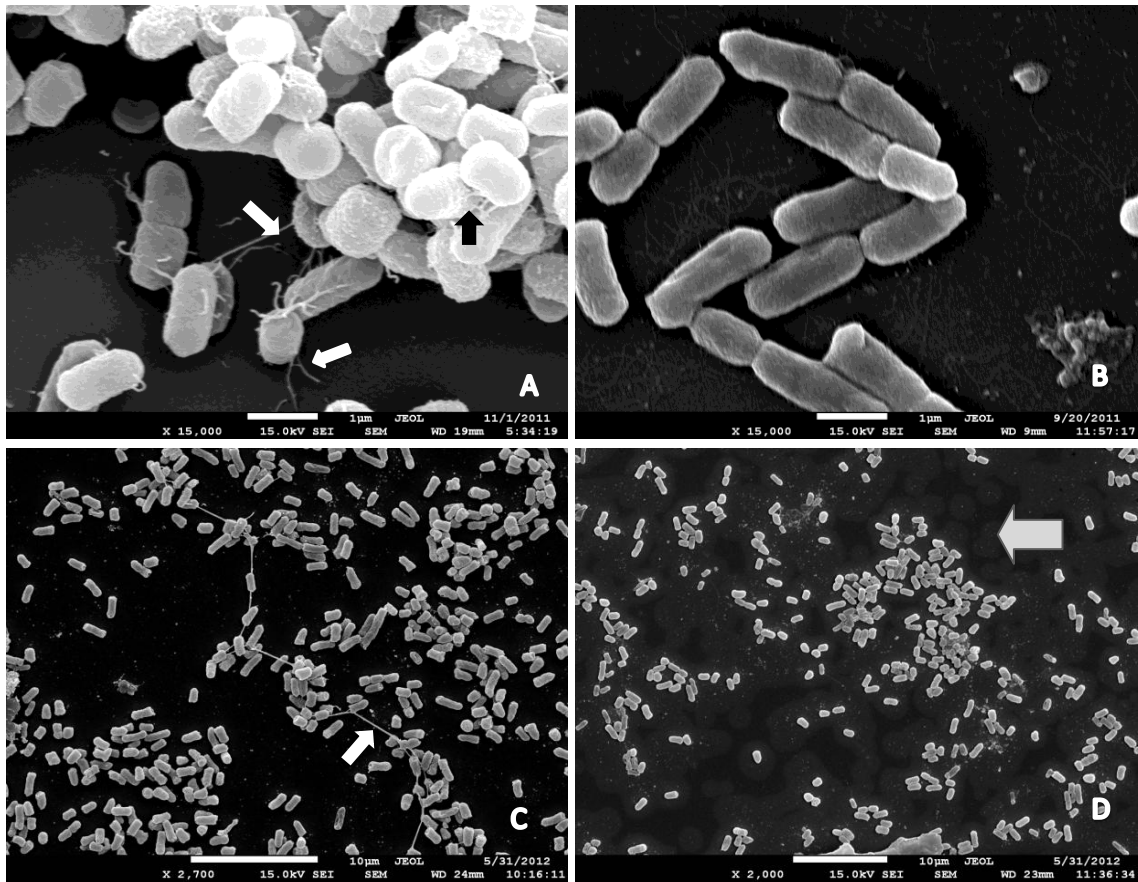


Figura 12 – Micrografias eletrônicas de biofilmes mistos. A e C mostram prováveis *pili F* (setas brancas) em biofilmes passíveis de inibição por zinco. Estruturas compatíveis com curli também puderam ser observadas em alguns destes biofilmes (seta preta). Biofilmes que não são passíveis de inibição por zinco, mostrando presença de matriz (seta cinza) são mostrados em B e D. Aumentos: A e B – 15000 x, C – 2700 x, D – 2000 vezes.

## 5- DISCUSSÃO

O intestino humano é colonizado por uma microbiota complexa e diversificada. As bactérias no trato gastrointestinal desempenham múltiplos papéis na saúde humana, como reações metabólicas ausentes em humanos (Bäckhed *et al.*, 2005), modulação da morfologia e fisiologia intestinais (Chowdhury *et al.*, 2007) e desenvolvimento do sistema imune (Kelly *et al.*, 2007; Heavey e Rowland, 2004; Björkstén *et al.*, 2001). A colonização começa no nascimento, mas a maturação da microbiota é um processo contínuo que dura vários anos (Yatsunencko *et al.*, 2012; Palmer *et al.*, 2012; Agans *et al.*, 2011).

Um dos primeiros anaeróbios facultativos a colonizar o intestino humano é *E. coli* (Eggesbø *et al.*, 2011; Brandt *et al.*, 2011). Existe um intenso debate se cepas de *E. coli* de adesão difusa (DAEC) representam habitantes normais do intestino ou cepas diarreiogênicas, porque muitos estudos epidemiológicos têm mostrado resultados conflitantes, alguns deles implicando DAEC em casos de diarreia (Baqui *et al.*, 1992; Guion *et al.*, 2008), em que aparecem por vezes em frequência elevada (Jallat *et al.*, 1993) enquanto em outros estudos são isoladas em frequências similares em casos e controles (Gomes *et al.*, 1989; Scaletsky *et al.*, 1999).

Um aspecto importante a ser considerado é o delineamento dos estudos. Em alguns casos utilizam-se amostras de conveniência, tais como a dos pacientes de um hospital, podendo mesmo inexistir um grupo controle (Por exemplo, Jallat *et al.*, 1994). Nesses casos, embora conhecendo a frequência de DAEC em casos de diarreia, não há como saber o quanto esta difere da população em geral.

Uma vez que alguns autores têm atribuído a controvérsia sobre a patogenia de DAEC à suscetibilidade dependente da idade (Scaletsky *et al.*, 2002; Opintan *et al.*, 2010; Ochoa *et al.*, 2009 a; Gunzburg *et al.*, 1993; Levine *et al.*, 1993; Meraz *et al.*, 2007) nós comparamos DAEC isoladas de quatro grupos diferentes: crianças com diarreia, crianças assintomáticas, adultos com diarreia e adultos controle. O trabalho utilizou duas abordagens diferentes, uma para as cepas isoladas de crianças e outra para as de adultos. A coleção de crianças é parte de um estudo do tipo caso-controle, o que significa que possíveis fatores de confusão, como a idade,



o nível sócio-econômico ou local de procedência dos participantes, foram minimizados. Já para a coleção de adultos foram estudados 143 casos de diarreia e 119 indivíduos assintomáticos.

Neste trabalho foram utilizadas somente DAEC que possuem adesinas Afa/Dr. Embora DAEC sejam definidas pelo padrão de adesão sobre células de cultura, entre as adesinas que já foram implicadas neste fenótipo, somente as da família Afa/Dr aparecem em frequências consideráveis em cepas de adesão difusa, enquanto outras adesinas são raras (Jallat *et al.*, 1994; Scaletsky *et al.*, 2002; Kaper *et al.*, 2004). Além disso, desde que o trabalho de Germani *et al.* (1996) demonstrou que somente DAEC positivas para a sonda *daaC* (que indica a presença das adesinas Afa/Dr) eram encontradas em frequência superior em casos de diarreia, esse grupo passou a ser alvo de maior interesse por parte dos pesquisadores.

Cepas DAEC Afa/Dr foram encontradas em frequências semelhantes em casos de diarreia em crianças e em controles assintomáticos. Mesmo se consideradas as crianças maiores de seis meses ou as maiores de um ano, não há diferença entre a frequência de DAEC em casos e controles. Na coleção de adultos, DAEC Afa/Dr foram significativamente mais frequentes nos casos do que em controles.

Grande parte dos mecanismos de virulência já propostos para essas bactérias dependem da presença das adesinas Afa/Dr. Foi demonstrado que a ligação da adesina ao receptor deflagra a ativação de rotas de transdução de sinal (Peiffer *et al.*, 1998) que levam ao desmonte da rede de actina (Bernet-Camard *et al.*, 1996), além da redistribuição de outras proteínas nos microvilos (Goluszco *et al.*, 1999), o que poderia levar a falhas na absorção e à conseqüente diarreia. Esses trabalhos descreveram um possível modelo para a patogenia de DAEC baseado na presença das adesinas fimbriais F1845 ou Dr, presentes nas cepas padrão utilizadas na condução dos estudos. Se o desmonte de microvilos é desencadeado como conseqüência da ligação de outras adesinas Afa/Dr, que são comuns em DAEC, é questão que permanece obscura.

Neste estudo, a adesina mais frequente foi Afa-I. Ela foi detectada em frequências similares em todos os grupos, independente de isolados ou não de casos de diarreia, não estando associada, portanto, à doença. F1845 foi encontrada

em frequência considerável nas cepas de crianças – 21,3%, se considerada a frequência em que aparece sozinho ou combinado a outros genes - porém com frequência maior ( $P < 0,05$ ) entre os controles assintomáticos (32,7%) do que entre os casos (8%). Nas amostras de adultos não chegou a ser detectada. Logo, a despeito dos mecanismos já descritos, a presença de F1845 falha em explicar o estabelecimento de doença diarreica nesta coleção de cepas. Idem para a fímbria Dr, que não foi encontrada.

Em 20% (30/150) das cepas *afaB-C* positivas, o gene E não pode ser identificado e as cepas foram denominadas “*afa-X*”. Cepas com *afaE* indeterminado têm sido encontradas eventualmente em trabalhos sobre DAEC. Zhang *et al.* (1997), que relataram novas variantes das adesinas Afa/Dr, foram os primeiros a referir essas cepas. Arikawa *et al.* (2005), encontraram 26,3% (5/19) de cepas isoladas de casos de diarreia em adulto com *afaE* indeterminado – que eles denominaram *afaEX*. Já Fujihara *et al.* (2009) encontraram cepas *afaEX* isoladas de adultos assintomáticos. É provável que existam muitas variantes ainda não descritas de adesinas Afa/Dr. Korotkova *et al.* (2007) mostraram que essas adesinas tendem a evoluir através de mutações de ponto, que resultam em variabilidade fenotípica e diferenças nas propriedades adesivas. Entretanto, neste trabalho, todas as cepas *afaX* de adultos parecem portar uma mesma adesina, que foi significativamente associada a diarreia. Essa adesina foi parcialmente caracterizada, confirmando estar relacionada com as adesinas Afa/Dr. Estudos ulteriores são necessários para confirmar seu envolvimento na patogênese de DAEC em adultos.

Alguns estudos sugerem que DAEC podem ser patogênicas ou não, dependendo da faixa etária. Scaletsky *et al.* (2002) encontraram DAEC associada a diarreia apenas em crianças com mais de um ano de idade. Já Opintan *et al.* (2010) encontraram DAEC como o único patotipo de *E. coli* associado a diarreia em adultos e crianças maiores de três anos de idade. Uma possível explicação poderia estar na diferença de expressão do receptor das adesinas Afa/Dr, DAF, em adultos e crianças. Segundo Waitumbi (*et al.*, 2004), a expressão de DAF nos glóbulos vermelhos varia de acordo com a idade do indivíduo, sendo mais baixa em crianças pequenas, subindo em crianças mais velhas ou adolescentes, e se mantendo alta nos adultos. Odhiambo *et al.* (2008) demonstraram que os níveis mais baixos de expressão de DAF em células vermelhas foram encontrados em crianças entre 24 e

36 meses de idade, uma faixa etária bastante explorada nos estudos sobre diarreia. Não se sabe se a expressão de DAF em enterócitos segue o padrão que foi observado em eritrócitos. Se for o caso, uma menor expressão do receptor nas crianças justificaria a dificuldade das bactérias em colonizar eficientemente o intestino das crianças, e conseqüentemente de causar doença. Neste quadro, uma mesma linhagem de DAEC poderia ser patogênica em adultos, e não patogênica em crianças.

Em 21,3% das cepas de crianças foram encontradas mais de uma adesina Afa/Dr. Afa-I e F1845 estiveram sempre presentes nessas associações. Ambas reconhecem DAF como receptor, e F1845 também reconhece CEACAMs. Caso a expressão de DAF em enterócitos siga o padrão visto para os eritrócitos, poderia explicar ainda a vantagem das cepas de crianças em possuir adesinas capazes de se ligar a outros receptores além de DAF.

No final dos anos cinquenta do século XX, o desenvolvimento de ensaios de soroaglutinação levou ao estabelecimento dos sorogrupos clássicos de EPEC, a partir dos sorogrupos das cepas que estavam frequentemente associadas a casos de diarreia infantil, bem como a surtos (Levine *et al.*, 1985). A Organização Mundial de Saúde reconhece 12 sorogrupos clássicos de EPEC: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 and O158 (OMS, 1987). Em razão da caracterização molecular adotada atualmente na classificação dos patótipos de *E. coli*, hoje se sabe que alguns dos chamados “sorogrupos de EPEC” são partilhados por outros patótipos (Pereira *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2004; Paciorek, 2002). No presente estudo, nós encontramos 30,5% das cepas DAEC Afa/Dr isoladas de crianças pertencendo aos sorogrupos O86, O127, O142 ou O158. O sorogrupo O86 foi o mais frequente, correspondendo, sozinho, a 20% das cepas isoladas de crianças. Esse é um sorogrupo que parece ser amplamente distribuído em *E. coli* pertencentes a diferentes patótipos, uma vez que pode ser encontrado em EAEC (Pereira *et al.*, 2007), STEC (Sang *et al.*, 2012) e DAEC (Paciorek, 2002). De modo interessante, nós não encontramos cepas DAEC isoladas de adultos pertencendo aos sorogrupos de EPEC, sugerindo que essas cepas podem ter origem distinta das cepas de crianças.

Em cepas de EPEC, o TTSS é parte da ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*). Ilhas de patogenicidade (PAIs) são conjuntos flexíveis de genes que codificam fatores de virulência, se localizam em regiões específicas do genoma, cujo conteúdo de G + C normalmente difere do restante do genoma e que estão presentes em patógenos mas não em cepas não patogênicas da mesma espécie, (Dutta e Paul, 2012). Neste estudo, genes que são parte do TTSS foram encontrados em cepas isoladas de crianças assintomáticas, em frequência bastante elevada. Não se sabe se essas cepas possuem ou não um TTSS funcional. Blanc-Potard *et al.* (2002) demonstraram que as cepas padrão de DAEC Afa/Dr C1845 e IH11128 possuem parte de uma PAI originalmente descrita em uma cepa uropatogênica de *E. coli*. De modo análogo, algumas cepas DAEC isoladas de crianças poderiam possuir uma versão truncada de LEE, incluindo parte do TTSS, mas não necessariamente o aparato funcional completo. É interessante que os genes do TTSS tenham sido encontrados apenas nas cepas de crianças, aquelas em que também foram encontrados alguns dos sorogrupos clássicos de EPEC – levando-nos a especular que as cepas de crianças talvez possam ser mais relacionadas a EPEC em termos evolutivos.

Embora grande ênfase seja dada ao papel do TTSS na patogenia, sua presença já foi registrada em bactérias não patogênicas, como *Pseudomonas fluorescens* (Preston *et al.*, 2001), um simbiote de plantas, e no simbiote da mosca tsé-tsé, *Sodalis glossinidius* (Dale *et al.*, 2001).

Formação de biofilmes havia sido relatada para cepas que possuem a adesina AIDA (Sherlock *et al.*, 2004; Pritchard *et al.*, 2004), mas não para as DAEC Afa/Dr que constituem a maior parte das cepas de adesão difusa. Uma vez que formação de biofilmes vem sendo considerada importante para a virulência, por exemplo, em EAEC, nós decidimos realizar ensaios para determiná-la. Raras foram as cepas capazes de formar biofilme em monocultura.

De um trabalho anterior (Pereira *et al.*, 2010), foi selecionada uma cepa de *C. freundii* (Cf 205) capaz de aumentar a formação de biofilmes de EAEC. Como a maioria das cepas DAEC não forma biofilmes ou o faz fracamente, nós decidimos investigar o efeito da interação dessas cepas com Cf 205 em ensaios de biofilmes

mistos. Quando as cepas foram cocultivadas com *Citrobacter freundii*, a maioria foi capaz de formar biofilmes, alguns de grande intensidade.

No estudo de Pereira *et al.* (2010) a formação de biofilmes mistos entre *C. freundii* e EAEC foi maior entre os isolados de casos de diarreia, sugerindo estar envolvida em sua etiologia. Aqui, um grande aumento na formação de biofilme foi observado especialmente quando as cepas de crianças assintomáticas foram empregadas nos ensaios de biofilmes mistos. Isso talvez se deva a maior diversidade de adesinas existente nessas cepas, que poderiam facilitar as interações com *C. freundii*. Além disso, essas cepas também mostraram maior produção de celulose, que é um importante componente da matriz dos biofilmes de *E. coli* e poderia facilitar a adesão dos consórcios bacterianos.

Outros componentes provavelmente envolvidos na formação dos biofilmes mistos são os *pili* F. A presença de *pili* grossos, de aparência flexível, que não formam feixes, foi confirmada pela microscopia de varredura. Endossando essas observações, essas estruturas foram observadas somente nos biofilmes inibidos por zinco, de cepas *traA* positivas, nos quais também foi possível observar fímbrias do tipo curli. Nenhuma dessas estruturas pôde ser observada nos biofilmes não afetados por zinco. May e Okabe (2008) mostraram que a expressão de curli a 37°C, durante a formação de biofilme, é induzida pela presença do plasmídeo conjugativo. Cepas de *E. coli* portando plasmídios conjugativos produzem biofilmes nos quais, nos estágios iniciais, *pili* F são as primeiras estruturas extracelulares a serem visualizadas. Em seguida, são produzidas fímbrias curli, necessárias à formação de um biofilme maduro. Nossos achados, portanto, estão em concordância com os de May e Okabe.

Os consórcios DAEC – *C. freundii* mostraram, além do aumento na formação de biofilme, grande aumento na adesão a células epiteliais. Isso sugere que cepas DAEC podem ter sua habilidade de colonização aumentada dependendo de outras bactérias que possam encontrar no intestino e das relações que estabelecerem.

A microbiota infantil em desenvolvimento não é formada por grupos de bactérias ao acaso, mas por consórcios bacterianos que interagem entre si (Koenig *et al.*, 2011). Dessa forma, a chance de uma determinada cepa de *E. coli* de se estabelecer no intestino deve ser determinada, em grande parte, pelos parceiros que

encontrará ao chegar ao intestino e pelas relações que estabelecer com eles. Biofilmes formados por múltiplas espécies, que mantêm complexas relações entre si, são o quadro predominante no intestino humano (Probert e Gibson, 2002). Logo, a capacidade de persistir em biofilmes que envolvem outras espécies bacterianas é provavelmente parte dos requisitos para que uma bactéria possa sobreviver e prosperar neste ambiente - e eventualmente desencadear um quadro patológico.

Quando Taddei *et al.* (2003) descreveram pela primeira vez a produção de uma toxina associada à diarreia infantil por DAEC, eles encontraram SAT em 44% das cepas isoladas de casos. Nós encontramos SAT em frequência praticamente igual (46%) nas cepas isoladas de casos de diarreia em crianças; essa frequência foi significativamente maior do que nas de controles assintomáticos (18,9%), corroborando os resultados de Taddei. Em contrapartida, a frequência de SAT na coleção de adultos foi bastante alta, tanto em isolados de casos de diarreia (66,7%) como de controles (86,6%), sugerindo que essa toxina esteja associada à diarreia somente em crianças.

O efeito de uma toxina e a resultante associação com diarreia depende da sua efetiva concentração no sítio de infecção, que por sua vez depende da densidade das células bacterianas que produzem a toxina. Embora SAT tenha sido encontrada em alta frequência em cepas de adultos, associação com diarreia foi encontrada apenas em crianças – justamente as cepas que demonstraram maior diversidade de adesinas, maior expressão de celulose e de formação de biofilmes mistos, ou seja, que possuem maior capacidade de colonização.

Este trabalho descreve, até onde sabemos pela primeira vez, a frequência de curli em DAEC. A expressão de curli pode ser determinada pelos morfotipos em meio CRI. Aqui, foi encontrado um morfotipo adicional, de coloração alaranjada, além dos registrados para Enterobacteriáceas. A existência de morfotipos adicionais em CRI já havia sido descrita para cepas de *E. coli* por Bokranz *et al.* (2005) que encontraram nada menos que oito diferentes morfotipos em cepas comensais e onze em isoladas de infecções urinárias. Todavia, eles não descreveram todos eles, impedindo uma comparação com o morfotipo alaranjado encontrado aqui. O trabalho de Bian *et al.* (2000), mostrou a existência de níveis diferentes de expressão de curli, associadas à intensidade da cor das colônias em CRI. As cepas alaranjadas

encontradas aqui correspondem à descrição das colônias (positivas para curli) “uma cruz” ou “duas cruzes” descritas por Bian. Pelo fato do ensaio em CRI basear-se na adsorção de um corante de cor vermelha, e porque as cepas alaranjadas foram negativas para celulose, nós creditamos esta coloração à expressão de curli - talvez em níveis menores aos observados para os morfotipos *rdar* ou *bdar*. A presença de curli nas cepas alaranjadas foi confirmada pelos estudos de microscopia. A coloração alaranjada a 37°C não corresponde ao morfotipo *rdar* (vermelho) a temperaturas mais baixas, pois quase todas as cepas alaranjadas exibiram o morfotipo *saw*, ou seja, foram incapazes de expressar curli a 28°C. Esse resultado contraria o que foi obtido para cepas de *Salmonella* por Römling *et al.* (2003). Mais estudos sobre a expressão de curli nas cepas de morfotipo alaranjado são necessários.

A expressão de curli foi frequente em cepas de crianças. Curli é uma estrutura bacteriana envolvida tanto na adesão a vegetais frescos (Berger *et al.*, 2010; Shaw *et al.*, 2008; Boyer *et al.*, 2007) como a várias proteínas de ampla distribuição nas células ou matriz extracelular em humanos, como MHC de classe I, TLR2, fibronectina e laminina (Barnhart e Chapman, 2006). Muitas das cepas DAEC Afa/Dr de crianças que expressam curli a 37°C também o fazem a 28°C. Assim, curli poderia facilitar a colonização por cepas de *E. coli* adquiridas pela ingestão de vegetais.

Segundo a literatura, a produção de curli é favorecida a temperaturas abaixo de 30°C, embora isolados clínicos expressem curli a 37°C (Barnhart e Chapman, 2006). De modo geral, uma proporção maior de cepas produziu curli a 37°. Porém, a expressão de curli em função da temperatura foi variável: algumas cepas foram positivas apenas a 37°C, algumas apenas a 28°C, outras em ambas as temperaturas e outras ainda, apesar de positivas para *csgA*, não expressaram curli, sugerindo que a expressão de curli pode ser altamente regulada nessas cepas. O morfotipo *rdar* vem sendo associado a cepas patogênicas (Uhlich *et al.*, 2006). Nós não encontramos um morfotipo em particular associado à diarreia. Em lugar disso, nós encontramos cepas DAEC expressando curli a 37°C em frequência significativamente superior em casos de diarreia em relação aos controles assintomáticos nas bactérias isoladas de adultos, sugerindo que curli pode ter um papel nas infecções entéricas. Nos últimos anos, vários estudos têm associado curli

à virulência em *E. coli* e outras enterobacteriáceas (Lawley *et al.*, 2006; Antão *et al.*, 2009). Além de ser um fator de colonização (Barnhart e Chapman, 2006), curli leva à estimulação da resposta inflamatória no hospedeiro (Bian *et al.*, 2000; Tükel *et al.*, 2009), a qual é mediada por TLR1/TLR2 (Tükel *et al.*, 2009). Curli foi ainda associada a maiores taxas de invasão de células epiteliais (Gophna *et al.*, 2001) e aumento de virulência em modelo murino (Uhlich *et al.*, 2001).

Curli compartilha muitas características com amiloides humanos (Chapman *et al.*, 2002). Sabe-se que amilóides possuem ação citotóxica (Kourie *et al.*, 2002). Depósitos de amiloides induzem inflamação crônica, que por sua vez resulta em injúrias teciduais associadas a doenças neurodegenerativas das quais a doença de Alzheimer é a mais notória. Algumas linhas de evidência sugerem que células de indivíduos mais velhos, pelo menos no caso de neurônios, podem ser mais suscetíveis à ação de amiloides (Brewer, 1998; Patel e Brewer, 2008; Brewer *et al.*, 2005). De modo análogo, enterócitos de adultos poderiam ser mais suscetíveis à ação de amiloides do que os de crianças, ajudando a explicar porque curli pôde ser associada à diarreia em adultos, mas não em crianças.

Arikawa *et al.* (2005) mostraram que a capacidade de cepas DAEC Afa/Dr em estimular a secreção de IL-8 por células epiteliais poderia estar envolvida no estabelecimento de diarreia. A importância do estímulo da secreção de IL-8 na patogenia de DAEC foi reforçada pelo estudo de Meraz *et al.* (2007). Em um trabalho mais recente, Arikawa e Nishikawa (2010) mostraram que altos níveis de secreção de IL-8 por células epiteliais estavam associados ao estímulo pelo flagelo, via TLR5. Nós encontramos cepas DAEC Afa/Dr capazes de estimular secreção de IL-8 por células HeLa. Entretanto, associação com a motilidade das cepas e, conseqüentemente, ao flagelo, não foi encontrada. Isso possivelmente se deve ao fato de que a quase totalidade das cepas aqui estudadas eram móveis. Nós também encontramos mais cepas capazes de estimular IL-8 entre as isoladas de crianças assintomáticas. A maioria, porém, estimulou apenas baixos níveis de secreção, o que poderia ao mesmo tempo explicar a falta de associação com diarreia e com a presença do flagelo.

Estudos recentes no campo da ecologia microbiana que tiram vantagem de métodos independentes de cultivo estão elucidando o processo de colonização do



intestino. Neste estudo, nós encontramos cepas DAEC Afa/Dr refletindo muitos princípios que se aplicam à microbiota em geral. Primeiro, do mesmo modo que a microbiota de crianças difere da de adultos, nós mostramos que DAEC Afa/Dr isoladas de crianças e de adultos representam duas populações diferentes, com perfis distintos em relação às características aqui estudadas. Segundo, do mesmo modo que a microbiota intestinal parece ser mais diversificada em pessoas saudáveis do que em pessoas com diarreia (Mai *et al.*, 2006), DAEC isoladas de controles assintomáticos apresentam maior diversidade.

Quiroga *et al.* (2000) demonstraram que cepas de *E. coli* de quatro diferentes categorias – inclusive DAEC e EPEC – podem ser encontradas colonizando crianças assintomáticas já nos primeiros meses de vida. Aqui, nós refinamos a análise para cepas DAEC Afa/Dr e encontramos cepas potencialmente patogênicas como parte da microbiota em crianças. Nós também demonstramos que muitas DAEC Afa/Dr pertencem a sorogrupos associados a EPEC, talvez refletindo uma relação evolutiva.

A participação de DAEC como agentes etiológicos de diarreia ainda é motivo de controvérsia. Nós encontramos que cepas de adultos e de crianças provavelmente possuem distintos mecanismos de virulência. DAEC Afa/Dr de crianças aparentemente possuem maior habilidade de colonizar o trato gastrointestinal, o que pode contribuir para a ação de uma toxina, como SAT. Nós também demonstramos que curli pode ter um papel na patogênese induzida por cepas DAEC Afa/Dr em adultos. Estudos posteriores são necessários para demonstrá-lo de forma conclusiva.

A utilização de probióticos consistindo de um único microrganismo (ou de uma mistura de uns poucos) tem sido investigada em vários tipos de doenças gastrointestinais como uma tentativa de substituir uma microbiota anormal ou patogênica por uma mais saudável. Contudo, os resultados desses estudos têm se mostrado pouco promissores (Shanahan, 2010). Em contraste, os transplantes de microbiota fecal – também conhecidos como transplantes fecais ou bacterioterapia fecal – vêm ganhando visibilidade, principalmente por sua utilização no tratamento de infecções por *Clostridium difficile* refratárias a outros tipos de tratamento (Bakken *et al.*, 2011). Apesar de antiga, recentemente essa técnica vem recebendo grande atenção, mostrando-se como uma alternativa promissora também para outros

distúrbios gastrointestinais como a colite ulcerativa (Borody *et al.*, 2003) ou doença inflamatória intestinal (Landy *et al.*, 2011). No caso das infecções por *C. difficile*, sua efetividade fica em torno de 90% (Agito *et al.*, 2013), similar à dos tratamentos convencionais com antibióticos (Venugopal e Johnson, 2012) e bastante superior à dos probióticos (Bakken *et al.*, 2011). O sucesso terapêutico dos transplantes de microbiota fecal representa um exemplo claro da importância das interações microbianas no intestino para a saúde humana. Aqui, nós demonstramos a importância das interações com outras bactérias para a formação de biofilmes por cepas DAEC, com prováveis implicações para a patogenia dessas bactérias. Esses exemplos mostram que o estudo centrado num único microrganismo muitas vezes não é suficiente para explicar o desenvolvimento das doenças causadas por microrganismos. Em lugar disso, estudos abrangendo as relações entre diferentes microrganismos deverão ocupar um papel central em Microbiologia.

## 6- CONCLUSÃO

Cepas DAEC Afa/Dr isoladas de crianças e adultos mostraram perfis muito distintos quanto à distribuição das características analisadas neste estudo. Características associadas à virulência mostraram-se menos frequentes nas cepas de adultos, que parecem constituir um grupo mais homogêneo.

Com exceção de SAT, marcadores de virulência foram mais comuns em cepas DAEC Afa/Dr isoladas de crianças assintomáticas. Nas cepas de adultos, curli é um possível fator de virulência.

Cepas isoladas de crianças possuem maior diversidade do que as cepas de adultos. A maior diversidade foi encontrada para as cepas de crianças assintomáticas. A maior diversidade de adesinas pode estar relacionada à maior eficiência na formação de biofilmes e, conseqüentemente, na maior eficiência na colonização, a depender das parcerias que as cepas DAEC estabelecerem no intestino. Por seu turno, o aumento no número de células, tal como visto em grande parte dos consórcios DAEC – *C. freundii*, ao resultar numa maior densidade populacional poderá potencializar a ação de uma toxina como SAT.

Genes do TTSS e sorogrupos clássicos de EPEC foram encontrados nas cepas DAEC Afa/Dr de crianças, mas não nas de adultos, sugerindo que essas cepas possuem origem distinta. Tomados juntos, os resultados indicam que DAEC Afa/Dr isoladas de crianças e adultos representam duas populações bacterianas diferentes.

## 7- PERSPECTIVAS

A realização dos ensaios de biofilmes mistos utilizando zinco mostrou que existem biofilmes mistos que podem ser inibidos por zinco, enquanto outros são insensíveis à sua presença. Esses biofilmes mostraram-se diferentes à microscopia eletrônica, com estruturas que possivelmente correspondem a *pili* conjugativos no primeiro caso, e com maior quantidade de matriz no segundo. Assim, apesar do efeito final ser idêntico nos dois casos – aumento na formação de biofilmes e da adesão – há, aparentemente, dois tipos distintos de interações DAEC/*C. freundii*. Estudos posteriores deverão esclarecer se há realmente dois tipos distintos de biofilmes mistos e quais estruturas medeiam o aumento de adesão em cada um dos casos.

Outra questão que se impõe é se a formação de biofilmes mistos mostrada aqui se trata de um fenômeno isolado associado exclusivamente a *C. freundii* ou se cepas DAEC podem estabelecer relações semelhantes com outras espécies bacterianas que fazem parte da microbiota humana. Assim, testes de biofilmes mistos envolvendo outras linhagens de *C. freundii* e outras espécies bacterianas estão sendo realizados.

Há ainda a ser considerada a questão da relação entre a formação de biofilmes mistos e patogenia. Biofilmes mistos desempenham papel relevante nas infecções associadas ao uso de cateteres, por exemplo. A formação de biofilmes mistos com cepas DAEC poderia estar associada ao desencadeamento de doenças, dependendo do microrganismo envolvido nestas associações.

## 8- REFERÊNCIAS

- ABBA K, SINFIELD R, HART CA, GARNER P. Pathogens associated with persistent diarrhoea in children in low and middle income countries: systematic review. *BMC Infect Dis*, 10;9:88, 2009.
- ADAMS JL, MCLEAN RJ. Impact of rpoS deletion on Escherichia coli biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 65:4285-7, 1999.
- AGANS R, RIGSBEE L, KENCHE H, MICHAIL S, KHAMIS HJ, PALIY O. Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. *FEMS Microbiol Ecol*,77:404-12, 2011.
- AGITO MD, ATREJA A, RIZK MK. Fecal microbiota transplantation for recurrent C difficile infection: Ready for prime time? *Cleve Clin J Med*, 80(2):101-8, 2013.
- Albert MJ; Faruque AS; Faruque SM; Sack RB; Mahalanabis D. *J Clin Microbiol*, 37(11):3458-64, 1999.
- ALMEIDA, RM. *Escherichia coli* de adesão difusa (DAEC) isoladas de infecções entéricas: frequência e caracterização de adesinas da família Afa/Dr. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde – Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Brasília. 2003.
- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215:403-10, 1990.
- ANDERSON GG, O'TOOLE GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322:85-105, 2008.
- ANTÃO EM, WIELER LH, EWERS C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. *Gut Pathog*, 1(1):22, 2009.
- ARIKAWA K, NISHIKAWA Y. Interleukin-8 induction due to diffusely adherent Escherichia coli possessing Afa/Dr genes depends on flagella and epithelial Toll-like receptor 5. *Microbiol Immunol*, 54:491-501, 2010.
- ARIKAWA K, MERAZ IM, NISHIKAWA Y, OGASAWARA J, HASE A. Interleukin-8 secretion by epithelial cells infected with diffusely adherent Escherichia coli possessing Afa adhesin-coding genes. *Microbiol Immunol*, 49:493-503, 2005.
- BÄCKHED F, LEY R; SONNENBURG JL, PETERSON DA, GORDON JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717):1915-20, 2005.
- BAQUI AH, RB SACK, RE BLACK, K HAIDER, A HOSSAIN, AR ALIM, M YUNUS, HR CHOWDHURY AK SIDDIQUE. Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladesh children less than 5 years of age. *J. Infect. Dis*, 166: 792:796, 1992.

BAKKEN JS, BORODY T, BRANDT LJ, BRILL JV, DEMARCO DC, FRANZOS MA, KELLY C, *et al.* Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. Fecal Microbiota Transplantation Workgroup. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 9:1044-9, 2011

BARNHART MM, CHAPMAN MR. Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol*, 60:131-47, 2006.

BELOIN C, ROUX A, GHIGO JM. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322:249-89, 2008.

BERGER CN, SODHA SV, SHAW RK, GRIFFIN PM, PINK D, HAND P, FRANKEL G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Viron Microbiol*, 12:2385-97, 2010.

BERGER CN, BILLKER O, MEYER TF, SERVIN A, KANSAU I. Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). *Mol Microbiol*, 52(4):963-83, 2004.

BERNET-CAMARD MF; COCONNIER MH; HUDALT S; SERVIN A. Pathogenicity of the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, 64:1918-28, 1996.

BENZ, I, M. SCHIMIDT. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 57:1506-1511, 1989.

BÉTIS F, BREST P, HOFMAN V, GUINOT J, BERNET-CAMARD MF, ROSSI B, SERVIN A, HOFMAN P. The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. *Infect Immun*, 71(3):1068-74, 2003 (a)

BÉTIS F, BREST P, HOFMAN V, GUINOT J, KANSAU I, ROSSI B, SERVIN A, HOFMAN P. Afa/Dr Diffusely adhering *Escherichia coli* infection in T84 cell monolayers induces increased neutrophil transepithelial migration, which in turn promotes cytokine-dependent upregulation of decay-accelerating factor (CD55), the receptor for Afa/Dr adhesins. *Infect Immun*, 71 (4):1774-83, 2003 (b).

BIAN Z, BRAUNER A, LI Y, NORMARK S. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J Infect Dis*, 181(2):602-12, 2000.

BIASUCCI G, BENENATI B, MORELLI L, BESSI E, BOEHM G. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria, *J Nutr*, 138:1796S-1800S, 2008.

BILGE S, CLAUSEN C, LAU W, MOSELEY S. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea associated *Escherichia coli* to Hep-2 cells. *J. Bacteriol*, 171:4281-4289, 1989.

BISCOLA FT, ABE CM, GUTH BE. Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. *Appl Environ Microbiol*, 77:2201-8, 2011.

BORODY T, WARREN E, LEIS S, SURACE R, ASHMAN O. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol*, 37:42-47, 2003.

BJÖRKSTÉN B, SEPP E, JULGE K, VOOR T; MIKELSAAR M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol*, 108(4):516-20, 2001.

BLANC-POTARD AB, TINSLEY C, SCALETSKY IC, LE BOUGUENEC C, GUIGNOT J, SERVIN AL, NASSIF X, BERNET-CAMARD M. Representational difference analysis between Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* and nonpathogenic *E. coli* K-12. *Infect Immun*, 70:5503-11, 2002.

BOKRANZ W, WANG X, TSCHÄPE H, RÖMLING U. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J Med Microbiol*, 54(Pt 12):1171-82, 2005.

BOYER RR, SUMNER SS, WILLIAMS RC, PIERSON MD, POPHAM DL, KNIEL KE. Influence of curli expression by *Escherichia coli* O157:H7 on the cell's overall hydrophobicity, charge, and ability to attach to lettuce. *J Food Prot*, 70:1339-45, 2007.

BRANDT K, TADDEI CR, TAKAGI EH, OLIVEIRA FF, DUARTE RT, IRINO I, MARTINEZ MB, CARNEIRO-SAMPAIO M. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. *Clinics (Sao Paulo)*, 67(2):113-23, 2012.

BREST P, BÉTIS F, ÇUBURU N, SELVA E, HERRANT M, SERVIN A, AUBERGER P, HOFMAN P. Increased Rate of Apoptosis and Diminished Phagocytic Ability of Human Neutrophils Infected with Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli* Strains. *Infect Immun*, 72:5741-49, 2004.

BREWER GJ, LIM A, CAPPS NG, TORRICELLI JR. Age-related calcium changes, oxyradical damage, caspase activation and nuclear condensation in hippocampal neurons in response to glutamate and beta-amyloid. *Exp Gerontol*, 40:426-37, 2005.

BREWER GJ. Age-related toxicity to lactate, glutamate, and beta-amyloid in cultured adult neurons. *Neurobiol Aging*, 19:561-8, 1998.

BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*, 3;198:773-83, 2012.

CAMPOS LC, FRANZOLIN MR, TRABULSI LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99:545-52, 2004.

CAMPOS LC, VIEIRA MA, TRABULSI LR, DA SILVA LA, MONTEIRO-NETO V, GOMES TA. Diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC) strains of fecal origin rarely express F1845 adhesin. *Microbiol Immunol*, 43(2):167-70, 1999.

CHOWDHURY SR, KING DE, WILLING BP, BAND MR, BEEVER JE, LANE AB *et al.*. Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets. *BMC Genomics*, 8:215, 2007.

CLEMENTS A, YOUNG JC, CONSTANTINO N, FRANKEL G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, 3:71-87, 2012.

COGAN TA, JORGENSEN F, LAPPIN-SCOTT HM, BENSON CE, WOODWARD MJ, HUMPHREY TJ. Flagella and curli fimbriae are important for the growth of *Salmonella enterica* serovars in hen eggs. *Microbiology*, 150(Pt 4):1063-71, 2004.

DALE C, YOUNG SA, HAYDON DT, WELBURN SC. The insect endosymbiont *Sodalis glossinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4):1883-8, 2001.

DIARD S, LIÉVIN-LE MOAL V, TORIBIO AL, BOUM Y, VIGIER F, SERVIN AL; BOUVET O. Norepinephrine-dependently released Dr fimbriae of diffusely adhering *Escherichia coli* strain IH11128 promotes a mitogen-activated protein kinase ERK1/2-dependent production of pro-inflammatory cytokine, IL-8 in human intestinal Caco-2/TC7 cells. *Microbes Infect*, 11(10-11):886-94, 2009.

DONLAN RM, COSTERTON JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15:167-93, 2002.

DOUGLAS LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*, 11:30-6, 2003.

DUTTA C, PAUL S. Microbial lifestyle and genome signatures. *Curr Genomics*, 13:153-62, 2012.

EBERL L, TÜMMLER B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *Int J Med Microbiol*, 294(2-3):123-31, 2004.

EGGESBØ M, MOEN B, PEDDADA S, BAIRD D, RUGTVEIT J, MIDTVEDT T, BUSHEL PR, SEKELJA M, RUDI K. Development of gut microbiota in infants not exposed to medical interventions. *APMIS*, 119(1):17-35, 2011.

FARFAN MJ, INMAN KG, NATARO JP. The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. *Infect Immun*, 76:4378-84, 2008.

FISCHER WALKER CL, PERIN J, ARYEE MJ, BOSCHI-PINTO C, BLACK RE. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. *BMC Public Health*. 2012 Mar 21;12:220.



FUJIHARA S, ARIKAWA K, AOTA T, TANAKA H, NAKAMURA H, WADA T, HASE A, NISHIKAWA Y. Prevalence and properties of diarrheagenic *Escherichia coli* among healthy individuals in Osaka City, Japan. *Jpn J Infect Dis*, 62:318-23, 2009.

GARCIA M, GOUNON P, COURCOUX P, LABIGNE A, LE BOUGUENEC C. The afimbrial adhesive sheath encoded by the *afa-3* gene cluster of pathogenic *Escherichia coli* is composed of two adhesins. *Mol. Microbiol*, 19(4):683-93, 1996.

GASTEIGER E, GATTIKER A, HOOGLAND C, IVANYI I, APPEL RD, BAIROCH A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 31:3784-3788, 2003.

GERMANI Y, BÉGAUD E, DUVAL P, LE BOUGUÉNEC C. Prevalence of enteropathogenic, enteroaggregative, and diffusely adherent *Escherichia coli* among isolates from children with diarrhea in New Caledonia. *J Infect Dis*, 174:1124-26, 1996.

GIEGERICH R, MEYER F, SCHLEIERMACHER C. GeneFisher - software support for the detection of postulated genes. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 4:68-77, 1996.

GOLUSZKO P, SELVARANGAN R, POPOV V, PHAM T, WEN JW, SINGHAL J. Decay-Accelerating Factor and Cytoskeleton Redistribution Pattern in HeLa Cells Infected with Recombinant *Escherichia coli* Strains Expressing Dr Family of Adhesins. *Infect Immun*, 67(8):3989-97, 1999.

GOMES TAT, BLAKE PA, TRABULSI LR. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. *J. Clin. Microbiol*, 27:266-269, 1989.

GOPHNA U, BARLEV M, SEIJFFERS R, OELSCHLAGER TA, HACKER J, RON EZ. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infect Immun*, 69:2659-65, 2001.

GUIGNOT J, CHAPLAIS C, COCONNIER-POLTER MH, SERVIN AL. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cell Microbiol*, 9(1):204-2, 2007.

GUIGNOT J, PEIFFER I, BERNET-CAMARD MF, LUBLIN DM, CARNOY C, MOSELEY SL, SERVIN A. Recruitment of CD55 and CD66e brush border-associated glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of the Afa/Dr diffusely adhering family of *Escherichia coli* that infect the human polarized intestinal CaCo-2/TC7 cells. *Infect. Immun*, 68:3554-3563, 2000.

GUION CE, OCHOA TJ, WALKER CM, BARLETTA F, CLEARY TG, DOUGLAS LJ. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 46:1752-57, 2008.

GUNZBURG ST, CHANG BJ, ELLIOTT SJ, BURKE V, GRACEY M. Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia. *J Infect Dis*, 167:755-8, 1993

GUYER DM, HENDERSON IR, NATARO JP, MOBLEY HL. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*, 38(1):53-66, 2000.

HEAVEY PM, ROWLAND IR. Microbial-gut interactions in health and disease. Gastrointestinal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 18:323-36, 2004.

HERNANDES RT, ELIAS WP, VIEIRA MA, GOMES TA. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 297(2):137-49, 2009.

HONDA K, TAKEDA K. Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal Immunol*, 2(3):187-96, 2009.

HUANG DB, MOHANTY A, DUPONT HL, OKHUYSEN PC, CHIANG T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol*, 55(Pt 10):1303-11, 2006.

HUANG DB, DUPONT HL. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging pathogen in children. *Semin Pediatr Infect Dis*, 15(4):266-71, 2004.

JALLAT C, DARFEUILLE-MICHAUD A, RICH C, JOLY B. Survey of clinical isolates of diarrhoeogenic *Escherichia coli*: diffusely adhering *E. coli* strains with multiple adhesive factors. *Res Microbiol*, 145(8):621-32, 1994.

JALLAT C, DARFEUILLE-MICHAUD A, RICH C, JOLY B. *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. *J Clin. Microbiol*, 31:2031-37, 1993.

JOUVE M, GARCIA MI, COURCOUX P, LABIGNE A, GOUNON P, LE BOUGUÉNEC C. Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic *Escherichia coli* carrying the afa-3 gene cluster are mediated by the AfaE and AfaD proteins, respectively. *Infect. Immun*, 70:2681-89, 1997.

KAI-LARSEN Y, LÜTHJE P, CHROMEK M, PETERS V, WANG X, HOLM A, KÁDAS L, HEDLUND KO, JOHANSSON J, CHAPMAN MR, JACOBSON SH, RÖMLING U, AGERBERTH B, BRAUNER A. 2010. Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS Pathog*. 6(7):e1001010.

KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2:123-40, 2004.

KONAR M, SACHIN O, PRIYA A, GHOSH S. Identification of key proteins of cultured human intestinal cells involved in interaction with enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 66(2):177-90, 2012.

KELLY D, KING T, AMINOV R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat Res*, 622(1-2):58-69, 2007.

KOENIG JE, SPOR A, SCALFONE N, FRICKER AD, STOMBAUGH J, KNIGHT R, ANGENENT LT, LEY RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (Suppl 1):4578-85, 2011.

KOROTKOVA N, CHATTOPADHYAY S, TABATA TA, BESKHLEBNAYA V, VIGDOROVICH V, KAISER BK, STRONG RK, DYKHUIZEN DE, SOKURENKO EV, MOSELEY SL. Selection for functional diversity drives accumulation of point mutations in Dr adhesins of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 64:180-94, 2007.

KOURIE JI, CULVERSON AL, FARRELLY PV, HENRY CL, LAOHACHAI KN. Heterogeneous amyloid-formed ion channels as a common cytotoxic mechanism: implications for therapeutic strategies against amyloidosis. *Cell Biochem Biophys*, 36(2-3):191-207, 2002.

KYAW CM, DE ARAUJO CR, LIMA MR, GONDIM EG, BRÍGIDO MM, GIUGLIANO LG. Evidence for the presence of a type III secretion system in diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC). *Infect Genet Evol*. 3(2):111-7, 2003.

LABIGNE-ROUSSEL A, FALKOW S. Distribution and degree of heterogeneity of the afimbrial-adhesin-encoding operon (afa) among uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Infect. Immun*, 56(3):640-48, 1988.

LABIGNE-ROUSSEL A, LARK D, SCHOOLNIK G, FALKOW S. Cloning and expression of an afimbrial adhesin (AFA-I) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from a pyelonephritic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun*, 46:251-59, 1984.

LANDY J, AL-HASSI HO, MCLAUGHLIN SD, WALKER AW, CICLITIRA PJ, NICHOLLS RJ, CLARK SK, HART AL. Review article: faecal transplantation therapy for gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 34:409-15, 2011.

LA RAGIONE RM, COOLEY WA, WOODWARD MJ. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *J Med Microbiol*, 49(4):327-38, 2000.

LAWLEY TD, CHAN K, THOMPSON LJ, KIM CC, GOVONI GR, MONACK DM. Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog*, 2(2):e11, 2006.

LE BOUGUÉNEC C, GARCIA MI, OUIN V, DESPERRIER JM, GOUNON P, LABIGNE A. Characterization of plasmid-borne afa-3 gene clusters encoding afimbrial adhesins expressed by *Escherichia coli* strains associated with intestinal or urinary tract infections. *Infect Immun*, 61:5106-14, 1993.

LE BOUGUENEC C, ARCHAMBAUD M, LABIGNE A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli*

strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30:1189-93, 1992.

LEVINE MM, NATARO JP, KARCH H, BALDINI MM, KAPER JB, BLACK RE, CLEMENTS ML, O'BRIEN AD. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis*, 152:550-9, 1985.

LIU L, JOHNSON HL, COUSENS S, PERIN J, SCOTT S, LAWN JE *et al.*; Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*, 379:2151-61, 2012.

LEVINE MM, FERRECCIO C, PRADO V, CAYAZZO M, ABREGO P, MARTINEZ J, *et al.* Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am J Epidemiol*, 15;138:849-69, 1993.

LEWIS K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)*, 70:267-74, 2005.

LOPES LM, FABBRICOTTI SH, FERREIRA AJ, KATO MA, MICHALSKI J, SCALETISKY IC. Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. *J Clin Microbiol*, 43(4):1968-72, 2005.

MAI V, BRADEN CR, HECKENDORF J, PIRONIS B, HIRSHON JM. Monitoring of stool microbiota in subjects with diarrhea indicates distortions in composition. *J Clin Microbiol*, 44:4550-2, 2006.

MAH TF, O'TOOLE GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 9:34-9, 2001

MARIAT D, FIRMESSE O, LEVENEZ F, GUIMARÃES V, SOKOL H, DORÉ J, CORTHIER G, FURET JP. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*, 9;9:123, 2009.

MARIN-ESTEBAN V, TURBICA I, DUFOUR G, SEMIRAMOTH N, GLEIZES A, GORGES R, *et al.* Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain C1845 induces neutrophil extracellular traps that kill bacteria and damage human enterocyte-like cells. *Infect Immun*, 80:1891-9, 2012.

MATHEWSON JJ, CRAVIOTO A. HEp-2 cell adherence as an assay for virulence among diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 159:1057-60, 1989.

MAY T, OKABE S. *Escherichia coli* harboring a natural IncF conjugative F plasmid develops complex mature biofilms by stimulating synthesis of colanic acid and Curli. *J Bacteriol*, 190:7479-90, 2008.

MATZ C, KJELLEBERG S. Off the hook-how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol*, 13:302-7, 2005.

MERAZ IM, JIANG ZD, ERICSSON CD, BOURGEOIS AL, STEFFEN R, TAYLOR DN, HERNANDEZ N, DUPONT HL. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and diffusely adherent *E. coli* as likely causes of a proportion of pathogen-negative travelers' diarrhea--a PCR-based study. *J Travel Med*, 15:412-18, 2008.

MERAZ IM, ARIKAWA K, NAKAMURA H, OGASAWARA J, HASE A, NISHIKAWA Y. Association of IL-8-inducing strains of diffusely adherent *Escherichia coli* with sporadic diarrheal patients with less than 5 years of age. *Braz J Infect Dis*, 11:44-9, 2007.

MURPHY TF, BAKALETZ LO, SMEESTERS PR. Microbial interactions in the respiratory tract. *Pediatr Infect Dis J*, 28(10 Suppl):S121-6, 2009.

NATARO JP, KAPER JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11:142-201, 1998

NGUYEN MH, OJIMA Y, KAWATA T, TAYA M. Alternation in colonization behaviors of *Escherichia coli* cells with *rpoS* or *yggE* deficiency on solid surfaces. *Biotechnol Bioeng*, 2012. doi: 10.1002/bit.24770. [Epub ahead of print]

OCHOA TJ, ECKER L, BARLETTA F, MISPIRETA ML, GIL AI, CONTRERAS C, *et al*. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from Periurban areas in Lima, Peru. *Clin Infect Dis*, 49:1694-702, 2009 (a)

OCHOA TJ, RUIZ J, MOLINA M, DEL VALLE LJ, VARGAS M, GIL AI, *et al*. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. *Am J Trop Med Hyg*, 81(2):296-301, 2009 (b)

ODHIAMBO CO, OTIENO W, ADHIAMBO C, ODERA MM, STOUTE JA. Increased deposition of C3b on red cells with low CR1 and CD55 in a malaria-endemic region of western Kenya: implications for the development of severe anemia. *BMC Med*, 6:23, 2008.

Organização Mundial de Saúde. Programme for Control of Diarrhoeal Diseases. *Manual for laboratory investigations of acute enteric infections*. Geneva. World Health Organization; 1987

OLIVEIRA TCR, LATORRE MR. Tendências da internação e da mortalidade infantil por diarreia: Brasil, 1995 a 2005. *Rev Saúde Pública*, 44:102-11, 2010.

OLSÉN A, WICK MJ, MÖRGELIN M, BJÖRCK L. Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect Immun*, 66:944-9, 1998.

OLSÉN A, JONSSON A, NORMARK S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*, 338:652-5, 1989.

OPINTAN JA, BISHAR RA, NEWMAN MJ, OKEKE IN. Carriage of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by older children and adults in Accra, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 104:504-6, 2010.

OSWALD E, SCHMIDT H, MORABITO S, KARCH H, MARCHÈS O, CAPRIOLI A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun*, 68:64-71, 2000.

PACIOREK J. Virulence properties of *Escherichia coli* faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhoea. *J Med Microbiol*, 51:548-56, 2002.

PALMER C, BIK EM, DIGIULIO DB, RELMAN DA, BROWN PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 5:e177, 2007.

PATEL JR, BREWER GJ. Age-related changes to tumor necrosis factor receptors affect neuron survival in the presence of beta-amyloid. *J Neurosci Res*, 86:2303-13, 2008.

PEIFFER I, SERVIN AL, BERNET-CAMARD MF. Piracy of decay-accelerating factor (CD55) signal transduction by the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845 promotes cytoskeletal F-actin rearrangements in cultured human intestinal INT407 cells. *Infect Immun*, 66:4036-42, 1998.

PEREIRA AL, SILVA TN, GOMES A, ARAÚJO AC, GIUGLIANO LG. Diarrhea-associated biofilm formed by enteroaggregative *Escherichia coli* and aggregative *Citrobacter freundii*: a consortium mediated by putative F pili. *BMC Microbiol*, 23;10:57, 2010.

PEREIRA AL, FERRAZ LR, SILVA RS, GIUGLIANO LG. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* serogroups. *J Infect Dis*, 195:366-74, 2007.

PERIASAMY S, KOLENBRANDER PE. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva. *Infect Immun*, 77:3542-51, 2009.

PESAVENTO C, BECKER G, SOMMERFELDT N, POSSLING A, TSCHOWRI N, MEHLIS A, HENGGE R. Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 22:2434-46, 2008.

PIVA, I C. Incidência e caracterização de *Escherichia coli* diarreio gênica isolada em Brasília. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. 1998.

PRESTON GM, BERTRAND N, RAINEY PB. Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Mol Microbiol*, 41:999-1014, 2001.

PRITCHARD J, NGELEKA M, MIDDLETON DM. In vivo and in vitro colonization patterns of AIDA-I-positive *Escherichia coli* isolates from piglets with diarrhea. *J Vet Diagn Invest*, 16:108-15, 2004.

PROBERT HM, GIBSON GR. Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Curr Issues Intest Microbiol*, 3:23-7, 2002.

QUIROGA M, OVIEDO P, CHINEN I, PEGELS E, HUSULAK E, BINZTEIN N, *et al.* Asymptomatic infections by diarrheagenic. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 42:9-15, 2000.

RAJENDRAN P, AJJAMPUR SS, CHIDAMBARAM D, CHANDRABOSE G, THANGARAJ B, SARKAR R, *et al.* Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 68:117-22, 2010.

RAVI M, NGELEKA M, KIM SH, GYLES C, BERTHIAUME F, MOUREZ M, *et al.* Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. *Vet Microbiol*, 120(3-4):308-19, 2007.

RODRIGUES J, CM THOMAZINI, A MORELLI, GC DE BATISTA. Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Brazilian infants. *J. Clin. Microbiol*, 42:398-400, 2004.

RODRIGUES J, ACOSTA VC, CANDEIAS JM, SOUZA LO, FILHO FJ. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Braz J Med Biol Res*, 35:1311-8, 2002.

RÖMLING U, BOKRANZ W, RABSCH W, ZOGAJ X, NIMTZ M, TSCHÄPE H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *Int J Med Microbiol*, 293:273-85, 2003.

SANG WK, BOGA HI, WAIYAKI PG, SCHNABEL D, WAMAE NC, KARIUKI SM. Prevalence and genetic characteristics of Shigatoxigenic *Escherichia coli* from patients with diarrhoea in Maasailand, Kenya. *J Infect Dev Ctries*, 6:102-8, 2012.

SCALETSKY IC, FABRICOTTI SH, CARVALHO RLB, NUNES CR, MORAIS MB, FAGUNDES-NETO U. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in northeast Brazil: a case-control study. *J Clin Microbiol*, 40:645-648, 2002.

SCALETSKY IC, PEDROZO MZ, MORAIS MB, CARVALHO R, SILVA RM, FABRICOTTI SH, FAGUNDES NETO, U. Association of patterns of *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells with acute and persistent diarrhea. *Arq Gastroenterol*. 36(1):54-60, 1999.

SCALETSKY IC, SILVA ML, TRABULSI LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun*, 45: 534-536, 1984.

- SÉMIRAMOTH N, GLEIZES A, TURBICA I, SANDRÉ C, GORGES R, KANSAU I, *et al.* *Escherichia coli* type 1 pili trigger late IL-8 production by neutrophil-like differentiated PLB-985 cells through a Src family kinase – and MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol*, 85:310-321, 2009.
- SERHAN CN, SAVILL J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*, 6(12):1191-7, 2005.
- SERVIN AL. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 18:264-92, 2005.
- SHANAHAN F. Probiotics in perspective. *Gastroenterology*, 139:1808-12, 2010.
- SHAW RK, BERGER CN, FEYS B, KNUTTON S, PALLAN MJ, FRANKEL G. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* exploits EspA filaments for attachment to salad leaves. *Appl Environ Microbiol*, 74:2908-14, 2008.
- SHERLOCK O, SCHEMBRI MA, REISNER A, KLEMM P. Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J Bacteriol*, 186(23):8058-65, 2004.
- SOLOMON EB, NIEMIRA BA, SAPERS GM, ANNOUS BA. Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *J Food Prot*, 68(5):906-12, 2005.
- SWANSON TN, BILGE SS, NOWICKI B, MOSELEY SL. Molecular structure of the Dr adhesin: nucleotide sequence and mapping of receptor-binding domain by use of fusion constructs. *Infect Immun*, 59:261-8, 1991.
- SPANO LC, A D SADOVSKY, P N SEQUI, K SAICK, SM. KITAGAWA, F. E. PEREIRA, IC SCALETSKY, U. FAGUNDES NETO. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. *J Med Microbiol*, 573:359-63, 2008.
- STEINER TS, NATARO JP, POTEET-SMITH CE, SMITH JA, GUERRANT LR. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest*, 105:1769-77, 2000.
- STOCKINGER B, VELDHOEN M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol*, 19(3):281-6, 2007.
- TADDEI CR, MORENO AC, FERNANDES FILHO A, MONTEMOR LP, MARTINEZ MP. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. *FEMS Microbiol Lett*, 24;227(2):249-53, 2003.
- TAMPAKAKI AP, FADOULOGLOU VE, GAZI AD, PANOPOULOS NJ, KOKKINIDIS M. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol*, 6:805-16, 2004.



TÜKEL C, WILSON RP, NISHIMORI JH, PEZESHKI M, CHROMY BA, BÄUMLER AJ. Responses to amyloids of microbial and host origin are mediated through toll-like receptor 2. *Cell Host Microbe*, 6:45-53, 2009.

UHLICH GA, ROGERS DP, MOSIER DA. Escherichia coli serotype O157:H7 retention on solid surfaces and peroxide resistance is enhanced by dual-strain biofilm formation. *Foodborne Pathog Dis*, 7:935-43, 2010.

UHLICH GA, COOKE PH, SOLOMON EB. Analyses of the red-dry-rough phenotype of an Escherichia coli O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Appl Environ Microbiol*, 72:2564-72, 2006.

UHLICH GA, KEEN JE, ELDER RO. Variations in the csgD promoter of Escherichia coli O157:H7 associated with increased virulence in mice and increased invasion of HEP-2 cells. *Infect Immun*, 70:395-9, 2002.

VAN HOUDT R, MICHIELS CW. Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. *Res Microbiol*, 156(5-6):626-33, 2005.

VENUGOPAL AA, JOHNSON S. Current state of Clostridium difficile treatment options. *Clin Infect Dis*, 55 Suppl 2:S71-6, 2012.

WAGGIE Z, HAWKRIDGE A, HUSSEY GD. Review of rotavirus studies in Africa: 1976-2006. *J Infect Dis*. 202 Suppl:S23-33, 2010.

WAITUMBI JN, DONVITO B, KISSERLI A, COHEN JH, STOUTE JA. Age-related changes in red blood cell complement regulatory proteins and susceptibility to severe malaria. *J Infect Dis*. 190(6):1183-91, 2004.

WAKIMOTO N, NISHI J, SHEIKH J, NATARO JP, SARANTUYA J, IWASHITA M *et al.*. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative Escherichia coli. *Am J Trop Med Hyg*, 71:687-690, 2004.

WEBER H, PESAVENTO C, POSSLING A, TISCHENDORF G, HENGGE R. Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of Escherichia coli. *Mol Microbiol*, 62:1014-34, 2006.

WEISS-MUSZKAT M, SHAKH D, ZHOU Y, PINTO R, BELAUSOV E, CHAPMAN MR, SELA S. Biofilm formation by and multicellular behavior of Escherichia coli O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. *Appl Environ Microbiol*. 76:1545-54. 2010.

YAMAMOTO T, WAKISAKA N, NAKAE T, KAMANO T, SERICHANTALERGS O, ECHEVARRIA P. Characterization of a novel hemagglutinin of diarrhea-associated Escherichia coli that has characteristics of diffusely adhering E. coli and enteroaggregative E. coli. *Infect. Immun*, 64:3694-3702, 1996.

YATSUNENKO T, REY FE, MANARY MJ, TREHAN I, DOMINGUEZ-BELLO MG, CONTRERAS M, *et al.*. Gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486: 222–227, 2012.

ZHANG L, FOXMAN B, TALLMAN P, CLADERA E, LE BOUGUÉNEC C, MARRS CF. Distribution of drb genes coding for Dr binding adhesins among uropathogenic and fecal *Escherichia coli* isolates and identification of new subtypes. *Infect. Immun*, 65:2011-18, 1997.

ZOGAJ X, BOKRANZ W, NIMTZ M, RÖMLING U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun*, 71(7):4151-8, 2003.

## 9- ANEXO A – Meios de cultura e soluções utilizados

Meios de cultura para bactérias

### 1.1.1.- LB – *Luria Broth*

Peptona	10 g
NaCl	10 g
Extrato de levedura	5g
Água destilada q.s.p	1 L

O pH foi ajustado para 7,4 e o meio esterilizado em autoclave a 120°C (1kgf/cm<sup>2</sup>) por 20 minutos.

### 1.1.2 – LB Agar

Peptona	10 g
NaCl	10 g
Extrato de levedura	5 g
Ágar	20 g
Água destilada q.s.p	1 L

O pH foi ajustado para 7,4 e o meio esterilizado em autoclave a 120°C (1kgf/cm<sup>2</sup>) por 20 minutos.

### 1.1.3- CRI – Congo Red Indicator

Casaminoácidos	10 g
Extrato de levedura	1 g
Ágar	20 g
Congo Red	50 mg
Comassie Blue	20 mg
Água destilada q.s.p	1 L

O pH foi ajustado para 7,4 e o meio esterilizado em autoclave a 120°C (1kgf/cm<sup>2</sup>) por 15 minutos.

### Meio Calcoflúor

Peptona	10 g
NaCl	10 g
Extrato de levedura	5 g
Calcoflúor	200 mg
Ágar	20 g
Água destilada q.s.p	1 L

O pH foi ajustado para 7,4 e o meio esterilizado em autoclave a 120°C (1kgf/cm<sup>2</sup>) por 15 minutos.

### Meio ágar semissólido

Peptona	5 g
Extrato de carne	3 g
Ágar	4 g
Água destilada q.s.p	1 L

O pH foi ajustado para 7,2 e o meio esterilizado em autoclave a 120°C (1kgf/cm<sup>2</sup>) por 15 minutos.

## 1.2- Utilizados para cultivo de células eucarióticas

Utilizadas para cultivo de células HeLa

### 1.2..1- DMEM

Para manutenção das células foi utilizado meio DMEM (Gibco) com glicose (4,5 g/L) suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado e 0,2% de antibióticos - ampicilina/estreptomicina. O meio foi esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm e estocado a 4°C.

### 2.1.2 – Solução estoque de antibióticos

Penicilina G	5000000 U/ml
Sulfato de estreptomicina	500000 U/ml

A solução foi esterilizada por filtração em membrana 0,22 µm e estocada a -20°C.

### 2.1.3- solução estoque de EDTA 0,33 M

A solução teve o pH ajustado para 7,0 e com NaOH 5 M. A solução foi esterilizada por filtração em membrana 0,22  $\mu\text{m}$  e estocada a 4°C. No momento do uso, 16  $\mu\text{L}$  desta solução foram diluídos em 10 mL de PBS glicosado.

### 2.1.4- Solução estoque de tripsina 5%

A solução teve o pH ajustado para 7,8 com NaOH 1M e, após ter sido mantida em repouso durante a noite a 4°C, o pH foi reajustado para 7,6. A solução foi clarificada por filtração em papel Whatman n<sup>o</sup> 1, esterilizada por filtração em membrana 0,22  $\mu\text{m}$  e estocada a -20°C. No momento do uso, 40  $\mu\text{L}$  desta solução foram diluídos em 10 mL de PBS glicosado acrescido de EDTA.

### 2.1.5- PBS glicosado – Tampão salina fosfato glicosado

NaCl	8 g
KCl	0,4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	0,39 g
Glicose	1,1 g
Água destilada q.s.p	1 L

A solução teve o pH ajustado para 7,4, foi esterilizada por filtração em membrana 0,22  $\mu\text{m}$  e estocada a 4°C.

### 2.1.6- Solução estoque de manose 20%

A solução teve foi esterilizada por filtração em membrana 0,22  $\mu\text{m}$  e estocada a 4°C.

## 2.2 - Utilizadas para eletroforese de proteínas e Western blot

### 2.2.1- Solução de bloqueio

Tris-HCl 10 mM pH 8,0	1 mL
NaCl	0,4 g
BSA	0,5 g

Água destilada q.s.p 50 mL

A solução foi armazenada a 4°C.

#### 2.2.2- TBS – Tampão salina tris

Tris-HCl 10 mM pH 7,4 1 L

NaCl 9 g

#### 2.2.3- Tampão para fosfatase

Tris-HCl 2M pH 9,5 0,1 L

NaCl 5,844 g

MgCl<sub>2</sub> 1,016 g

Água destilada q.s.p 1 L

#### 2.2.4- Tampão de transferência

Trizma base 5,8 g

Glicina 2,93 g

SDS 0,37 g

Metanol 200 mL

Água destilada q.s.p 1 L

#### 2.2.5- PBS – Tampão salina fosfato

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g

Água destilada q.s.p 1 L

#### 2.2.6- Solução acrilamida/Bis 30%

Acrilamida 29,2 g

N´N´-bis-metileno-acrilamida 0,8 g

Água destilada q.s.p 0,1 L

A solução foi filtrada em filtro 0,45µm e estocada a 4°C em frasco escuro.

#### 2.2.7- Tampão Tris-HCl 1,5M

Trizma base	18,15 g
Água destilada q.s.p	0,1 L

O pH foi ajustado para 8,8 com HCl 6M e estocado a 4°C.

#### 2.2.8- Tampão Tris-HCl 0,5M

Trizma base	6,05 g
Água destilada q.s.p	0,1 L

O pH foi ajustado para 6,8 com HCl 6M e estocado a 4°C.

#### 2.2.9- Tampão de corrida 5X

Trizma base	15 g
Glicina	72 g
SDS	5 g
Água destilada q.s.p	1 L

O pH foi ajustado para 8,3 e a solução foi estocada a 4°C.

#### 2.2.10- Tampão de amostra

Tris-HCl 0,32M pH 6,8	6,4 mL
Sacarose	4,8 g
SDS	0,8 g
β-mercaptoetanol	0,8 mL
Azul de bromofenol	0,02 g
Água destilada q.s.p	10 mL

A solução foi estocada a 4°C.

#### 2.2.11- Solução corante

Solução A	
Azul de comassie G-250	0,5 g
Ácido fosfórico 2%	5,85 mL
Sulfato de amônio	50 g
Água destilada q.s.p	0,5 L

Na hora do uso, foram utilizados 80% da solução A e 20% de metanol.

#### 2.2.12- Solução descorante

Metanol	200 mL
Água destilada q.s.p	1 L

A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

#### 2.2.13- Solução plastificadora

Glicerol	5 mL
Metanol	150 mL
Água destilada q.s.p	0,5 L

A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

#### 2.3- Utilizadas para coloração

##### 2.3.1- Solução aquosa de cristal violeta (CV)

Cristal violeta em concentração de 0,1% foi mantido em frasco escuro à temperatura ambiente. No momento do uso, a solução foi filtrada em membrana de 0,22 $\mu$ M.

##### 2.3.2- Solução de May-Grünwald

No momento do uso, a solução alcóolica de May-Grünwald foi diluída 1:20 em tampão Sørensen e filtrada em membrana de 0,22 $\mu$ M.

##### 2.3.3- Tampão Sørensen

Solução A	0,908% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Solução B	0,947% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

O tampão Sørensen foi obtido ajustando o pH da solução B em 7,3 utilizando a solução A. No momento do uso, o tampão foi diluído (1:2) em água destilada.

##### 2.2.4- Solução estoque de Giemsa

Giemsa	0,362 g
Metanol	30,43 mL
Glicerol	19,56 mL



A solução foi mantida à temperatura ambiente em frasco âmbar. No momento do uso, esta solução foi diluída 1:40 em tampão Sørensen e filtrada em membrana 0,22 µm.

### 2.3 Utilizadas em eletroforese em géis de agarose

#### 2.3.1- Tampão acetato (TAE) 40X

Trizma base	193,8 g
Acetato de sódio	108,9 g
EDTA	14,9 g
Água destilada q.s.p.	1 L

O pH foi ajustado para 8,2 e a solução foi acondicionada à temperatura ambiente. No momento do uso, 25 mL dessa solução foram diluídos em 975 mL de água destilada.

#### 2.3.2- Tampão de amostra para DNA

Sacarose	65% (m/V)
Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	10 mM
Azul de bromofenol	0,3% (m/V)

#### 2.3.3- Solução de brometo de etídio para detecção de fragmentos de DNA

Brometo de etídio	100 mg
Água destilada q.s.p.	10 mL

A solução foi mantida a 4°C em frasco âmbar. No momento do uso, 25 µL desta solução foram diluídos em 500 mL de água destilada.

# 10- ANEXO B – *afaE-1* (sequência parcial) de cepa *afaE-1*<sup>+</sup>/ *afaE-2*<sup>+</sup>

**BLAST®** Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI Sign In Register

NCBI/BLAST/blastn suite/Formatting Results - F2U3SRUT01R

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

Change the result display back to traditional format

You Tube Learn about the enhanced report Blast report description

### Nucleotide Sequence (208 letters)

Query ID |c|18731 Database Name nr  
 Description None Description Nucleotide collection (nt)  
 Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.2.27+ Citation  
 Query Length 208

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results

### Graphic Summary

Distribution of 29 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Color key for alignment scores

Query 1 40 80 120 160 200

### Descriptions

Provide feedback on the new report

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli strain HM358 AfaA (afaA), AfaB (afaB), AfaC (afaC), AfaD (afaD), DraP (draP), anc</a>	307	307	85%	2e-80	98%	<a href="#">JN688153.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">E.coli afaE-1 gene</a>	307	307	85%	2e-80	98%	<a href="#">X69197.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli diffuse adherence fibrillar adhesin gene locus, complete sequence</a>	289	289	80%	7e-75	98%	<a href="#">AF325672.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2065 Dr adhesin gene, complete cds</a>	281	281	78%	1e-72	98%	<a href="#">DQ386044.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2150 Dr adhesin gene, complete cds</a>	278	278	78%	1e-71	97%	<a href="#">DQ386043.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli afa operon, strain FV9863</a>	276	276	77%	5e-71	98%	<a href="#">FM955458.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2184 Dr adhesin gene, complete cds</a>	255	255	72%	7e-65	97%	<a href="#">DQ386042.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2185 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386041.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate SM624 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386038.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate SM247 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386037.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate SM248 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386036.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate SM23 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386035.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate SM18 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386034.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate SM250 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386033.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2105 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386032.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2116 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386031.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2103 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386030.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2120 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386029.1</a>

<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2124 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386028.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2092 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386027.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2169 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386026.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2091 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386024.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2090 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386023.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2085 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386022.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2059 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386021.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2143 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386020.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2170 Dr adhesin gene, complete cds</a>	246	246	69%	4e-62	97%	<a href="#">DQ386019.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli isolate G2212 Dr adhesin gene, complete cds</a>	241	241	69%	2e-60	97%	<a href="#">DQ386025.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">E.coli afaE gene coding for a mannose-resistant hemagglutinin AFA-I</a>	193	193	55%	5e-46	97%	<a href="#">M12888.1</a>

**Alignments**

[Provide feedback on the new report](#)

Download [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli strain HM358 AfaA (afaA), AfaB (afaB), AfaC (afaC), AfaD (afaD), DraP (draP), and AfaE (afaE) genes, complete cds  
 Sequence ID: [gb|JN688153.1](#) Length: 6700 Number of Matches: 1

Range 1: 6166 to 6344 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
307 bits(166)	2e-80	175/179(98%)	1/179(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGACGGGCAAA			85
Sbjct 6166	ATGGGACCCAGACGGCGGTGATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGACGGGCAGA			6225
Query 86	TGGTGTTCAICGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCTGAACC			145
Sbjct 6226	TGGTGTTCAICGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCTGAACC			6285
Query 146	TCGAAGGCGGTTTCTGGACAAAATAATCTGACCGGGTCTGGTTGTATTACCGAAGCC			204
Sbjct 6286	TCGAAGGCGGTTTCTGGACAAAATAATCTGACCGGGTCTGGTTGTATTACCGAAGCC			6344

**Related Information**

Download [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

E. coli afaE-1 gene  
 Sequence ID: [emb|X69197.1](#) Length: 681 Number of Matches: 1

Range 1: 501 to 679 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
307 bits(166)	2e-80	175/179(98%)	1/179(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGACGGGCAAA			85
Sbjct 501	ATGGGACCCAGACGGCGGTGATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGACGGGCAGA			560
Query 86	TGGTGTTCAICGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCTGAACC			145
Sbjct 561	TGGTGTTCAICGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCTGAACC			620
Query 146	TCGAAGGCGGTTTCTGGACAAAATAATCTGACCGGGTCTGGTTGTATTACCGAAGCC			204
Sbjct 621	TCGAAGGCGGTTTCTGGACAAAATAATCTGACCGGGTCTGGTTGTATTACCGAAGCC			679

**Related Information**

Download [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli diffuse adherence fibrillar adhesin gene locus, complete sequence  
 Sequence ID: [gb|AF325672.1](#) Length: 6138 Number of Matches: 1

Range 1: 5965 to 6133 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
289 bits(156)	7e-75	165/169(98%)	1/169(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGACGGGCAAA			85
Sbjct 5965	ATGGGACCCAGACGGCGGTGATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGACGGGCAGA			6024
Query 86	TGGTGTTCAICGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCTGAACC			145
Sbjct 6025	TGGTGTTCAICGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCTGAACC			6084
Query 146	TCGAAGGCGGTTTCTGGACAAAATAATCTGACCGGGTCTGGTTGTATT			194
Sbjct 6085	TCGAAGGCGGTTTCTGGACAAAATAATCTGACCGGGTCTGGTTGTATT			6133

**Related Information**

Download [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate G2065 Dr adhesin gene, complete cds  
 Sequence ID: [gb|DQ386044.1](#) Length: 506 Number of Matches: 1

**Related Information**

Range 1: 341 to 505 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
281 bits(152)	1e-72	161/165(98%)	1/165(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGAAACGGGCAAA	85		
Sbjct 341	ATGGGACCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGAAACGGGCAAA	400		
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	145		
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	460		
Query 146	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAATCTGACCGCGGTCTGGTTG	190		
Sbjct 461	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAATCTGACCGCGGTCTGGTTG	505		

[Download](#) ▼ [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate G2150 Dr adhesin gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|DQ386043.1](#) Length: 507 Number of Matches: 1

**Related Information**

Range 1: 341 to 506 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
278 bits(150)	1e-71	161/166(97%)	2/166(1%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGAAACGGGCAAA	85		
Sbjct 341	ATGGGACCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGAAACGGGCAAA	400		
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	145		
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	460		
Query 146	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAATCTGACCGCGGT-CTGGTTG	190		
Sbjct 461	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAATCTGACCGCGGTCTGGTTG	506		

[Download](#) ▼ [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli afa operon, strain FV9863  
Sequence ID: [emb|FM955458.1](#) Length: 5791 Number of Matches: 1

**Related Information**

Range 1: 5630 to 5791 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
276 bits(149)	5e-71	158/162(98%)	1/162(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGAAACGGGCAAA	85		
Sbjct 5630	ATGGGACCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGAAACGGGCAAA	5689		
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	145		
Sbjct 5690	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	5749		
Query 146	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAATCTGACCGCGGTCTGG	187		
Sbjct 5750	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAATCTGACCGCGGTCTGG	5791		

[Download](#) ▼ [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate G2184 Dr adhesin gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|DQ386042.1](#) Length: 491 Number of Matches: 1

**Related Information**

Range 1: 341 to 491 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
255 bits(138)	7e-65	147/151(97%)	1/151(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGAAACGGGCAAA	85		
Sbjct 341	ATGGGACCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGAAACGGGCAAA	400		
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	145		
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	460		
Query 146	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAATCTGA	176		
Sbjct 461	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAATCTGA	491		

[Download](#) ▼ [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate G2185 Dr adhesin gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|DQ386041.1](#) Length: 486 Number of Matches: 1

**Related Information**

Range 1: 341 to 486 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-62	142/146(97%)	1/146(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGAAACGGGCAAA	85		
Sbjct 341	ATGGGACCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGAAACGGGCAAA	400		
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	145		
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	460		
Query 146	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA	171		
Sbjct 461	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA	486		

Download ▾ GenBank Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate SM624 Dr adhesin gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|DQ386038.1](#) Length: 486 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 341 to 486 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-62	142/146(97%)	1/146(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAAA			85
Sbjct 341	ATGGGACCCCAAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAAA			400
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC			145
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC			460
Query 146	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			171
Sbjct 461	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			486

Download ▾ GenBank Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate SM247 Dr adhesin gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|DQ386037.1](#) Length: 486 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 341 to 486 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-62	142/146(97%)	1/146(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAAA			85
Sbjct 341	ATGGGACCCCAAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAAA			400
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC			145
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC			460
Query 146	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			171
Sbjct 461	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			486

Download ▾ GenBank Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate SM248 Dr adhesin gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|DQ386036.1](#) Length: 486 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 341 to 486 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-62	142/146(97%)	1/146(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAAA			85
Sbjct 341	ATGGGACCCCAAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAAA			400
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC			145
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC			460
Query 146	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			171
Sbjct 461	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			486

Download ▾ GenBank Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate SM23 Dr adhesin gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|DQ386035.1](#) Length: 486 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 341 to 486 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-62	142/146(97%)	1/146(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAAA			85
Sbjct 341	ATGGGACCCCAAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAAA			400
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC			145
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC			460
Query 146	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			171
Sbjct 461	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			486

Download ▾ GenBank Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate SM18 Dr adhesin gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|DQ386034.1](#) Length: 486 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 341 to 486 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-62	142/146(97%)	1/146(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAAA			85

```

Sbjct 341 ATGGGACCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGCGAGA 400
Query 86 TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCGGAACC 145
Sbjct 401 TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCGGAACC 460
Query 146 TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA 171
Sbjct 461 TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA 486

```

Download ▾ GenBank Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate SM250 Dr adhesin gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|DQ386033.1](#) Length: 486 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 341 to 486 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-62	142/146(97%)	1/146(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGCGAAA			85
Sbjct 341	ATGGGACCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGCGAGA			400
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCGGAACC			145
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCGGAACC			460
Query 146	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			171
Sbjct 461	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			486

Download ▾ GenBank Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate G2105 Dr adhesin gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|DQ386032.1](#) Length: 486 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 341 to 486 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-62	142/146(97%)	1/146(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGCGAAA			85
Sbjct 341	ATGGGACCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGCGAGA			400
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCGGAACC			145
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCGGAACC			460
Query 146	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			171
Sbjct 461	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			486

Download ▾ GenBank Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate G2116 Dr adhesin gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|DQ386031.1](#) Length: 486 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 341 to 486 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-62	142/146(97%)	1/146(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGCGAAA			85
Sbjct 341	ATGGGACCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGCGAGA			400
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCGGAACC			145
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCGGAACC			460
Query 146	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			171
Sbjct 461	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			486

Download ▾ GenBank Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate G2103 Dr adhesin gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|DQ386030.1](#) Length: 486 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 341 to 486 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-62	142/146(97%)	1/146(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-CCCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGCGAAA			85
Sbjct 341	ATGGGACCCAGACGGCGGTGTATATTATATCAACCGGGACGGGAACGGGCGAGA			400
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCGGAACC			145
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCGGAACC			460
Query 146	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			171
Sbjct 461	TCGAAGGCGGTTCTGGACAAAATAA			486

Download ▾ GenBank Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate G2120 Dr adhesin gene, complete cds

Escherichia coli isolate G2120 Dr adhesin gene, complete cds  
 Sequence ID: [gb|DQ386029.1](#) Length: 486 Number of Matches: 1

**Related Information**

Range 1: 341 to 486 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-62	142/146(97%)	1/146(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-COCCAGACGGCGGTGTATATTATAITCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAA	85		
Sbjct 341	ATGGGACCCAAGACGGCGGTGTATATTATAITCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAA	400		
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	145		
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	460		
Query 146	TCGAAGGCGGGTTCTGGACAAAATAA	171		
Sbjct 461	TCGAAGGCGGGTTCTGGACAAAATAA	486		

[Download](#) ▼ [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate G2124 Dr adhesin gene, complete cds  
 Sequence ID: [gb|DQ386028.1](#) Length: 486 Number of Matches: 1

**Related Information**

Range 1: 341 to 486 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-62	142/146(97%)	1/146(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGG-COCCAGACGGCGGTGTATATTATAITCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAA	85		
Sbjct 341	ATGGGACCCAAGACGGCGGTGTATATTATAITCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAA	400		
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	145		
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	460		
Query 146	TCGAAGGCGGGTTCTGGACAAAATAA	171		
Sbjct 461	TCGAAGGCGGGTTCTGGACAAAATAA	486		

[Download](#) ▼ [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Escherichia coli isolate G2092 Dr adhesin gene, complete cds  
 Sequence ID: [gb|DQ386027.1](#) Length: 486 Number of Matches: 1

**Related Information**

Range 1: 341 to 486 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
246 bits(133)	4e-62	142/146(97%)	1/146(0%)	Plus/Plus
Sbjct 341	ATGGGACCCAAGACGGCGGTGTATATTATAITCAACCGGGACGGGAACGGGACGGGCGAA	400		
Query 86	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	145		
Sbjct 401	TGGTGTTCATCGTACGAAATGACCAACAGCACCTACCAACCGGCAAGTACACCCCTGAACC	460		
Query 146	TCGAAGGCGGGTTCTGGACAAAATAA	171		
Sbjct 461	TCGAAGGCGGGTTCTGGACAAAATAA	486		

Loading alignment...

# 11- ANEXO C – *afaE-2* (sequência parcial) de cepa *afaE-1<sup>+</sup>/*afaE-2<sup>+</sup>**

**BLAST®** Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/BLAST/blastn suite/ Formatting Results - F2VXN7BZ015

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#) [Change the result display back to traditional format](#)

[You Tube](#) [Learn about the enhanced report](#) [Blast report description](#)

### Nucleotide Sequence (302 letters)

Query ID: Id|1505 Database Name: nr  
 Description: None Description: Nucleotide collection (nt)  
 Molecule type: nucleic acid Program: BLASTN 2.2.27+ [Citation](#)  
 Query Length: 302

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

### Graphic Summary

Distribution of 4 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

### Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Escherichia coli isolate G2064 Dr adhesin gene, complete cds</a>	558	558	100%	7e-156	100%	<a href="#">DQ386016.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Escherichia coli isolate G2081 Dr adhesin gene, complete cds</a>	558	558	100%	7e-156	100%	<a href="#">DQ386015.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Escherichia coli isolate G2177 Dr adhesin gene, complete cds</a>	558	558	100%	7e-156	100%	<a href="#">DQ386014.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">E.coli afaE-2 gene</a>	558	558	100%	7e-156	100%	<a href="#">X85782.1</a>

### Alignments

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Escherichia coli isolate G2064 Dr adhesin gene, complete cds  
 Sequence ID: [gb|DQ386016.1](#) Length: 495 Number of Matches: 1

Range 1: 6 to 307 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
558 bits(302)	7e-156	302/302(100%)	0/302(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  AAACAAAACGCTTATGACCATGATACTATGCGGGACCTTGTGGGACTACGCACGCAGC 60
Sbjct 6  AAACAAAACGCTTATGACCATGATACTATGCGGGACCTTGTGGGACTACGCACGCAGC 65

Query 61  GGTGGATAAACACGCACAGGCACCTACACACTAAACGTGACCGAAGAAATGTGCCGTGCA 120
Sbjct 66  GGTGGATAAACACGCACAGGCACCTACACACTAAACGTGACCGAAGAAATGTGCCGTGCA 125

Query 121 CCTAACCGACACACCGAATCATTACGCAAGACTGACTTAACAGAGGTAAACTCCTTCGC 180
Sbjct 126 CCTAACCGACACACCGAATCATTACGCAAGACTGACTTAACAGAGGTAAACTCCTTCGC 185

Query 181  AGGCGTTGGCCTTTCGCCCACAGGATGCGCAAACCTTAAGGTTGCCCTCTCGGCCGACGC 240
Sbjct 186  AGGCGTTGGCCTTTCGCCCACAGGATGCGCAAACCTTAAGGTTGCCCTCTCGGCCGACGC 245

Query 241  CGGGAACCTCAAGGGCACAATAATCCTGCTCAAGGGCGCGACAAAACGAGCTTCAITCC 300
Sbjct 246  CGGGAACCTCAAGGGCACAATAATCCTGCTCAAGGGCGCGACAAAACGAGCTTCAITCC 305

Query 301  AG 302
Sbjct 306  AG 307
  
```

**Related Information**



Escherichia coli isolate G2081 Dr adhesin gene, complete cds  
 Sequence ID: [gb|DQ386015.1](#) Length: 495 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 6 to 307 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
558 bits(302)	7e-156	302/302(100%)	0/302(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAACAAAACGCTTATGACCATGATACTATGCGGGACCTTTGTTGGGACTACGCACGCAGC			60
Sbjct 6	AAACAAAACGCTTATGACCATGATACTATGCGGGACCTTTGTTGGGACTACGCACGCAGC			65
Query 61	GGTGGATAAACACGCAACAGGCACCTACACACTAAACGTGACCGAAGAATGTCCCGTGCA			120
Sbjct 66	GGTGGATAAACACGCAACAGGCACCTACACACTAAACGTGACCGAAGAATGTCCCGTGCA			125
Query 121	CCTAACCGCAACACCGAATCATTACGCAAGACTGACTTAACAGAAGGTAACCTCCTCGC			180
Sbjct 126	CCTAACCGCAACACCGAATCATTACGCAAGACTGACTTAACAGAAGGTAACCTCCTCGC			185
Query 181	AGGCGTTGGCCTTTCGCGCACAGGATGCGCAAACTCTAAGGTTGCCITCTCGCCGACGC			240
Sbjct 186	AGGCGTTGGCCTTTCGCGCACAGGATGCGCAAACTCTAAGGTTGCCITCTCGCCGACGC			245
Query 241	CGGGAACCTCAAGGGCACAAATATCCTGCTCAAGGGCGCGCAAAAACGAGCTTCATTCC			300
Sbjct 246	CGGGAACCTCAAGGGCACAAATATCCTGCTCAAGGGCGCGCAAAAACGAGCTTCATTCC			305
Query 301	AG 302			
Sbjct 306	AG 307			

Escherichia coli isolate G2177 Dr adhesin gene, complete cds  
 Sequence ID: [gb|DQ386014.1](#) Length: 495 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 6 to 307 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
558 bits(302)	7e-156	302/302(100%)	0/302(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAACAAAACGCTTATGACCATGATACTATGCGGGACCTTTGTTGGGACTACGCACGCAGC			60
Sbjct 6	AAACAAAACGCTTATGACCATGATACTATGCGGGACCTTTGTTGGGACTACGCACGCAGC			65
Query 61	GGTGGATAAACACGCAACAGGCACCTACACACTAAACGTGACCGAAGAATGTCCCGTGCA			120
Sbjct 66	GGTGGATAAACACGCAACAGGCACCTACACACTAAACGTGACCGAAGAATGTCCCGTGCA			125
Query 121	CCTAACCGCAACACCGAATCATTACGCAAGACTGACTTAACAGAAGGTAACCTCCTCGC			180
Sbjct 126	CCTAACCGCAACACCGAATCATTACGCAAGACTGACTTAACAGAAGGTAACCTCCTCGC			185
Query 181	AGGCGTTGGCCTTTCGCGCACAGGATGCGCAAACTCTAAGGTTGCCITCTCGCCGACGC			240
Sbjct 186	AGGCGTTGGCCTTTCGCGCACAGGATGCGCAAACTCTAAGGTTGCCITCTCGCCGACGC			245
Query 241	CGGGAACCTCAAGGGCACAAATATCCTGCTCAAGGGCGCGCAAAAACGAGCTTCATTCC			300
Sbjct 246	CGGGAACCTCAAGGGCACAAATATCCTGCTCAAGGGCGCGCAAAAACGAGCTTCATTCC			305
Query 301	AG 302			
Sbjct 306	AG 307			

E.coli afaE-2 gene  
 Sequence ID: [emb|X85782.1](#) Length: 846 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 169 to 470 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
558 bits(302)	7e-156	302/302(100%)	0/302(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAACAAAACGCTTATGACCATGATACTATGCGGGACCTTTGTTGGGACTACGCACGCAGC			60
Sbjct 169	AAACAAAACGCTTATGACCATGATACTATGCGGGACCTTTGTTGGGACTACGCACGCAGC			228
Query 61	GGTGGATAAACACGCAACAGGCACCTACACACTAAACGTGACCGAAGAATGTCCCGTGCA			120
Sbjct 229	GGTGGATAAACACGCAACAGGCACCTACACACTAAACGTGACCGAAGAATGTCCCGTGCA			288
Query 121	CCTAACCGCAACACCGAATCATTACGCAAGACTGACTTAACAGAAGGTAACCTCCTCGC			180
Sbjct 289	CCTAACCGCAACACCGAATCATTACGCAAGACTGACTTAACAGAAGGTAACCTCCTCGC			348
Query 181	AGGCGTTGGCCTTTCGCGCACAGGATGCGCAAACTCTAAGGTTGCCITCTCGCCGACGC			240
Sbjct 349	AGGCGTTGGCCTTTCGCGCACAGGATGCGCAAACTCTAAGGTTGCCITCTCGCCGACGC			408
Query 241	CGGGAACCTCAAGGGCACAAATATCCTGCTCAAGGGCGCGCAAAAACGAGCTTCATTCC			300
Sbjct 409	CGGGAACCTCAAGGGCACAAATATCCTGCTCAAGGGCGCGCAAAAACGAGCTTCATTCC			468
Query 301	AG 302			
Sbjct 469	AG 470			

# 12- ANEXO D – Gene *afa-X*

BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

[My NCBI](#)  
[\[Sign In\]](#) [\[Register\]](#)

Home Recent Results Saved Strategies Help

---

▶ NCB/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - F2SWE983015

[Edit and Resubmit](#)
[Save Search Strategies](#)
[Formatting options](#)
[Download](#)
[Change the result display back to traditional format](#)

[You Tube](#) [Learn about the enhanced report](#) [Blast report description](#)

### Nucleotide Sequence (783 letters)

<b>Query ID</b>  cl 11379 <b>Description</b>  None <b>Molecule type</b>  nucleic acid <b>Query Length</b>  783	<b>Database Name</b>  nr <b>Description</b>  Nucleotide collection (nt) <b>Program</b>  BLASTN 2.2.27+ <a href="#">▶ Citation</a>
---	---

Other reports: [▶ Search Summary](#) [\[Taxonomy reports\]](#) [\[Distance tree of results\]](#)

**Graphic Summary**

Distribution of 1 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Color key for alignment scores

<40	40-50	50-80	80-200	>=200
-----	-------	-------	--------	-------

Query

1      150      300      450      600      750

**Descriptions** [Provide feedback on the new report](#)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#)
[Download](#)
[GenBank](#)
[Graphics](#)
[Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<a href="#">Escherichia coli Dr-family adhesin (drbE121) gene, complete cds</a>	512	512	42%	2e-141	95%	<a href="#">U87540.1</a>

**Alignments** [Provide feedback on the new report](#)

[Download](#)
[GenBank](#)
[Graphics](#)

Escherichia coli Dr-family adhesin (drbE121) gene, complete cds  
 Sequence ID: [gb|U87540.1|ECU87540](#) Length: 483 Number of Matches: 1

Range 1: 145 to 476 [GenBank](#) [Graphics](#)
[Next Match](#) [Previous Match](#)

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	512 bits(277)	2e-141	314/332(95%)	1/332(0%)	Plus/Plus	
Query	180		GCACATAAACGACATACCGAATTGCACGACCGGGCGGTTCTGGGAGAAGTCTCCGTCAGT			239
Sbjct	145		GCAATAAACGACAGCGAATTGCACGACCGGGCGGTTCTGGGAGAAGTCTCCGTCAGT			204
Query	240		GGGGTGGGTGCGGTACCGACCAAGCGCGTGGCGGTGAGTGGGGTAAATTTTATGACGGA			299
Sbjct	205		GGGGTGGGTGCGGTACCGACCAAGCGCGTGGCGGTGAGTGGGGTAAATTTTATGACGGA			264
Query	300		ACCTTTGGCTTTTTTATGACCCAAAGACGGCGGGACATAAAAACTGACCGCCACCTAGCC			359
Sbjct	265		ACCAATGGCTTTTTTATGACCCAAAGACGGCGGGACAGAAAACTGACCGTCGACCTAGCC			324
Query	360		ACTAATGGCGACCAATGGAAAAAGGATAACGGCGTGTATTACCGCGCCCGGGTGGGGAC			419
Sbjct	325		ACTAATGGCGACCAATGGAAAAAGGATAACGGCGTGTATTACCGCGCCCGGGTGGGGAC			384
Query	420		TGGACTGTATAGATCGCTATTATTGTACGGGGGAAACAGGTGAACAAAACCGACCGTAAA			479
Sbjct	385		TGGACTGGAAGATCGGTATTATTGTACGGGGGAAACAGGTGAACAAAACCGACCGTAAA			444
Query	480		TACACCAITGCACCCAGATGI-GGTTTCTGGGC			510
Sbjct	445		TACACCAITGAACCTAGATGGCGCTACTGGGC			476

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine.

[Copyright](#) | [Disclaimer](#) | [Privacy](#) | [Accessibility](#) | [Contact](#) | [Send feedback](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#) | [DHHS](#)

# 13- ANEXO E – Putativa proteína Afa-X

**BLAST®** Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/BLAST/blastp suite/ Formatting Results - F2Y0B97S01R

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

Change the result display back to traditional format

You Tube Learn about the enhanced report Blast report description

### Protein Sequence (201 letters)

**Query ID** |cl|96920  
**Description** |None  
**Molecule type** |amino acid  
**Query Length** |201

**Database Name** |nr  
**Description** |All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects  
**Program** |BLASTP 2.2.27+ Citation

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results Related Structures Multiple alignment

**New** DELTA-BLAST, a more sensitive protein-protein search **Go**

### Graphic Summary

Show Conserved Domains

Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.

Query seq. Superfamilies

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

**Color key for alignment scores**

Score Range	Color
<40	Black
40-50	Blue
50-80	Green
80-200	Magenta
>=200	Red

### Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Dr-family adhesin DrbE-121 [Escherichia coli]	195	195	55%	5e-60	86%	AAB96839.1
<input type="checkbox"/> Chain B, Daae Adhesin >pdb 2BCM A Chain A, Daae Adhesin >pdb 2BCM C Chain C, Daae	71.2	71.2	56%	1e-12	36%	2BCM_B
<input type="checkbox"/> fimbrial protein [Escherichia coli KTE216] >ref ZP_20292269.1  fimbrial protein [Escherichia	70.9	70.9	52%	1e-12	37%	ZP_19739801.1

Provide feedback on the new report

RecName: Full=F1845 fimbrial protein; AltName: Full=Fimbrial adhesin F1845 antigen; Flag	70.9	70.9	52%	2e-12	37%	<a href="#">P13719.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	69.7	69.7	53%	3e-12	40%	<a href="#">ABD93416.1</a>
<a href="#">DafaE [Escherichia coli]</a>	69.7	69.7	59%	3e-12	36%	<a href="#">AAK17183.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli] &gt;qb ABD93382.1 Dr adhesin [Escherichia coli] &gt;qb ABD93383</a>	69.3	69.3	45%	5e-12	42%	<a href="#">ABD93380.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	68.9	68.9	45%	6e-12	42%	<a href="#">ABD93385.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	68.9	68.9	45%	8e-12	42%	<a href="#">ABD93381.1</a>
<a href="#">dr-family adhesin [Escherichia coli MS 21-1] &gt;sp P08180.2 AFAE1_ECOLX RecName: Full=</a>	68.6	68.6	45%	8e-12	42%	<a href="#">ZP_07154171.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	68.6	68.6	45%	9e-12	42%	<a href="#">ABD93379.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	68.6	68.6	45%	1e-11	42%	<a href="#">ABD93403.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	68.2	68.2	51%	1e-11	37%	<a href="#">ABD93447.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	68.2	68.2	53%	1e-11	36%	<a href="#">ABD93437.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	68.2	68.2	53%	1e-11	40%	<a href="#">ABD93405.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	68.2	68.2	53%	1e-11	35%	<a href="#">ABD93439.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	68.2	68.2	53%	1e-11	39%	<a href="#">ABD93417.1</a>
<a href="#">hypothetical protein WE9_05263 [Escherichia coli KTE21] &gt;qb ELC33465.1 hypothetical pro</a>	67.8	67.8	53%	2e-11	35%	<a href="#">ZP_19637737.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli] &gt;qb ABD93436.1 Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	67.8	67.8	53%	2e-11	35%	<a href="#">ABD93429.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	67.4	67.4	53%	2e-11	35%	<a href="#">ABD93431.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	67.4	67.4	53%	2e-11	35%	<a href="#">ABD93400.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	67.4	67.4	53%	2e-11	35%	<a href="#">ABD93438.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	67.4	67.4	53%	2e-11	40%	<a href="#">ABD93422.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	67.4	67.4	53%	3e-11	35%	<a href="#">ABD93432.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli] &gt;qb ABD93415.1 Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	67.4	67.4	53%	3e-11	39%	<a href="#">ABD93409.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	67.0	67.0	53%	3e-11	39%	<a href="#">ABD93425.1</a>
<a href="#">Chain A, Complex Of E. Coli Drae Adhesin With Chloramphenicol &gt;pdb 1USQ B Chain B, Co</a>	67.0	67.0	53%	3e-11	39%	<a href="#">1USQ_A</a>
<a href="#">RecName: Full=Dr hemaagglutinin structural subunit; Flags: Precursor &gt;qb AAA23709.1 Dr h</a>	67.0	67.0	53%	3e-11	39%	<a href="#">P24093.1</a>
<a href="#">Chain A, Drae Adhesin From Escherichia Coli &gt;pdb 1UT1 B Chain B, Drae Adhesin From Es</a>	66.6	66.6	53%	3e-11	39%	<a href="#">1UT1_A</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	67.0	67.0	53%	3e-11	35%	<a href="#">ABD93430.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	66.2	66.2	72%	7e-11	32%	<a href="#">ABD93442.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	65.9	65.9	45%	7e-11	41%	<a href="#">ABD93393.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli] &gt;qb ABD93434.1 Dr adhesin [Escherichia coli] &gt;qb ABD93435</a>	65.9	65.9	53%	9e-11	35%	<a href="#">ABD93433.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	65.9	65.9	53%	9e-11	39%	<a href="#">ABD93418.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	65.5	65.5	53%	1e-10	38%	<a href="#">ABD93424.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	65.1	65.1	53%	1e-10	38%	<a href="#">ABD93421.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli] &gt;qb ABD93446.1 Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	64.7	64.7	50%	2e-10	37%	<a href="#">ABD93377.1</a>
<a href="#">Dr-family adhesin DrbE-122 [Escherichia coli]</a>	64.7	64.7	56%	2e-10	32%	<a href="#">AAB47759.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	64.3	64.3	50%	2e-10	37%	<a href="#">ABD93378.1</a>
<a href="#">Chain A, Afae-3 Adhesin From Escherichia Coli &gt;pdb 1UT2 B Chain B, Afae-3 Adhesin From</a>	64.3	64.3	53%	2e-10	38%	<a href="#">1UT2_A</a>
<a href="#">Chain B, The Solution Structure Of The Invasive Tip Complex From Afa-Dr Fibrils &gt;pdb 2VER</a>	63.9	63.9	53%	3e-10	38%	<a href="#">2IXQ_B</a>
<a href="#">Chain A, Semet Afae-3 Adhesin From Escherichia Coli</a>	64.3	64.3	53%	3e-10	38%	<a href="#">1USZ_A</a>
<a href="#">Chain A, Solution Structure Of The Engineered Protein Afae-Dsc</a>	64.3	64.3	53%	3e-10	38%	<a href="#">1RXL_A</a>
<a href="#">RecName: Full=Afimbrial adhesin AFA-III; Flags: Precursor &gt;emb CAA48847.1 AFA-III adhes</a>	64.3	64.3	53%	3e-10	38%	<a href="#">Q57254.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	63.2	63.2	55%	7e-10	32%	<a href="#">ABD93368.1</a>
<a href="#">hypothetical protein A1UW_03967 [Escherichia coli KTE80] &gt;qb ELE67542.1 hypothetical pr</a>	62.8	62.8	55%	8e-10	32%	<a href="#">ZP_19869492.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	62.8	62.8	53%	9e-10	37%	<a href="#">ABD93410.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	62.0	62.0	55%	2e-09	31%	<a href="#">ABD93364.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	60.1	60.1	55%	7e-09	33%	<a href="#">ABD93361.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	60.1	60.1	55%	9e-09	34%	<a href="#">ABD93373.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	59.7	59.7	47%	1e-08	38%	<a href="#">ABD93444.1</a>
<a href="#">AfaE-V adhesin [Escherichia coli]</a>	59.3	59.3	56%	2e-08	33%	<a href="#">CAA62863.1</a>
<a href="#">hypothetical protein WGO_05036 [Escherichia coli KTE85] &gt;qb ABD93356.1 Dr adhesin [Es</a>	58.2	58.2	55%	4e-08	31%	<a href="#">ZP_20370808.1</a>
<a href="#">hypothetical protein A15K_03092 [Escherichia coli KTE205] &gt;ref ZP_20262695.1 hypothetic</a>	57.4	57.4	55%	7e-08	31%	<a href="#">ZP_19709216.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	57.4	57.4	55%	8e-08	31%	<a href="#">ABD93357.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	56.6	56.6	55%	1e-07	30%	<a href="#">ABD93358.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	56.6	56.6	55%	2e-07	31%	<a href="#">ABD93445.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli] &gt;qb ABD93372.1 Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	56.2	56.2	56%	2e-07	30%	<a href="#">ABD93369.1</a>

<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	56.2	56.2	53%	2e-07	36%	<a href="#">ABD93399.1</a>
<a href="#">putative adhesin [Escherichia coli 3431] &gt;reflZP_13682939.1 adhesin fimbrial protein [Esch</a>	48.5	48.5	31%	3e-05	41%	<a href="#">ZP_11490057.1</a>
<a href="#">Dr adhesin [Escherichia coli]</a>	48.1	48.1	52%	2e-04	33%	<a href="#">ABD93443.1</a>
<a href="#">Dr adhesin partial [Escherichia coli]</a>	45.4	45.4	42%	0.001	34%	<a href="#">AFJ79746.1</a>
<a href="#">Dr adhesin partial [Escherichia coli]</a>	45.1	45.1	42%	0.002	34%	<a href="#">AFJ79745.1</a>
<a href="#">mannose-resistant hemagglutinin AFA-I precursor [Escherichia coli]</a>	39.7	39.7	28%	0.19	41%	<a href="#">AAA23981.1</a>
<a href="#">heat shock protein Hsp90 [Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum PC1] &gt;qblACT1</a>	37.4	37.4	54%	2.8	30%	<a href="#">YP_003016664.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286] &gt;reflZP_1448</a>	37.0	37.0	54%	3.5	30%	<a href="#">YP_005225501.1</a>
<a href="#">chaperone htpG [Klebsiella sp. 4_1_44FAA] &gt;qblEHL93853.1 chaperone htpG [Klebsiella s]</a>	37.0	37.0	54%	3.5	30%	<a href="#">ZP_09345204.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Enterobacter aerogenes KCTC 2190] &gt;qblAEG97515.1 heat shock p</a>	37.0	37.0	54%	3.5	30%	<a href="#">YP_004592794.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Klebsiella pneumoniae 342] &gt;reflYP_003440837.1 heat shock protei</a>	37.0	37.0	54%	3.5	30%	<a href="#">YP_002240025.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578] &gt;reflYP_00</a>	37.0	37.0	54%	3.5	30%	<a href="#">YP_001334137.1</a>
<a href="#">molecular chaperone HtpG [Klebsiella sp. 1_1_55] &gt;qblEFD84881.1 molecular chaperone</a>	37.0	37.0	54%	3.5	30%	<a href="#">ZP_06549537.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTUH-K2044] &gt;reflZP_0</a>	37.0	37.0	54%	3.5	30%	<a href="#">YP_002918177.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2] &gt;</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">NP_459482.2</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. E98-2068] &gt;re</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">ZP_03375836.1</a>
<a href="#">chaperone htpG [Citrobacter sp. A1] &gt;reflZP_16276841.1 heat shock protein 90 [Citrobacter</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">ZP_10409398.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport str. CVM 4176]</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">ZP_13420812.1</a>
<a href="#">chaperone protein htpG [Shigella flexneri 1235-66] &gt;qblEIQ77416.1 chaperone protein htpG</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">ZP_14870771.1</a>
<a href="#">Hsp90 protein [Salmonella enterica subsp. houtenae str. ATCC BAA-158.1] &gt;qblEHY69409.1</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">ZP_17126602.1</a>
<a href="#">chaperone htpG [Citrobacter freundii 4_7_47CFAA] &gt;qblEHL83236.1 chaperone htpG [Citro]</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">ZP_09334383.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Montevideo str. 4441 HI]</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">ZP_11767838.1</a>
<a href="#">Chaperone protein HtpG [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Give str. S5-487] &gt;qbl</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">ZP_12131780.1</a>
<a href="#">heat shock protein HtpG [Salmonella bongori NCTC 12419] &gt;emblC29527.1 heat shock</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">YP_004729338.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Montevideo str. 315996]</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">ZP_11691922.1</a>
<a href="#">Chaperone protein htpG Heat shock protein htpG: High temperature protein G [Salmonella e</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">YP_006884771.1</a>
<a href="#">chaperone protein HtpG [Citrobacter youngae ATCC 29220] &gt;qblEFE08463.1 chaperone pr</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">ZP_06353942.1</a>
<a href="#">heat shock protein HtpG [Citrobacter sp. 30_2] &gt;qblEEH91913.1 heat shock protein HtpG IC</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">ZP_04560937.1</a>
<a href="#">chaperone protein HtpG [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky str. CDC 19]</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">ZP_02656536.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B str. SPB7] &gt;</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">YP_001589280.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Citrobacter koseri ATCC BAA-895] &gt;sp A8AJX0.1 HTPG_CITK8_Recl</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">YP_001454219.1</a>
<a href="#">RecName: Full=Chaperone protein HtpG; AltName: Full=Heat shock protein HtpG; AltName:</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">Q5PFK7.2</a>
<a href="#">RecName: Full=Chaperone protein HtpG; AltName: Full=Heat shock protein HtpG; AltName:</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">Q57S77.2</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-Bf</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">YP_215515.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. ATCC 91</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">YP_151433.1</a>
<a href="#">heat shock protein HtpG [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. D23</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">YP_005231622.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18] &gt;emblC</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">NP_455083.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Salmonella enterica subsp. arizonae serovar 62:z4:z23:- str. RSK298]</a>	37.0	37.0	54%	3.8	30%	<a href="#">YP_001571450.1</a>
<a href="#">hypothetical protein CRE_21307 [Caenorhabditis remanei] &gt;qblFFP09876.1 hypothetical pr</a>	36.2	36.2	33%	4.8	31%	<a href="#">XP_003100118.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin str. CT_0202185]</a>	36.2	36.2	54%	5.8	30%	<a href="#">YP_002214440.1</a>
<a href="#">heat shock protein 90 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport str. CVM 19443]</a>	36.2	36.2	54%	6.0	30%	<a href="#">ZP_13399148.1</a>
<a href="#">heat shock protein HtpG [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum/pullorum]</a>	36.2	36.2	54%	6.0	30%	<a href="#">YP_005213611.1</a>

Alignments

[Provide feedback on the new report](#)

Download [GenPept](#) [Graphics](#)

Next Previous Descriptions

Dr-family adhesin DrbE-121 [Escherichia coli]  
Sequence ID: [qblAAB96839.1](#) Length: 160 Number of Matches: 1

Related Information

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
195 bits(496)	5e-60	Compositional matrix adjust.	97/113(86%)	103/113(91%)	2/113(1%)
Query 59	VAHKRHTLHDRAVLGEVSVSGVCGTDQRVAVSAGNFYDGTGFFMTQDGGI-KLIAHL				117
Sbjct 48	+A+KR +ELHDRAVLGEVSVSGVCGTDQRV VSAGNFYDGT GFFMTQDGGI KLT L IANKRQSELHDRAVLGEVSVSGVCGTDQRVPSAGNFYDGTGTFMTQDGGTEKLTVDL				107
Query 118	AINGDQWKKDNGVYRAAGGDWI-VIAIIVRGEQVKNKPIGKYIMHPDGGFWAN				169
Sbjct 118	AINGDQWKKDNGVYRAAGGDWI I IIVRGEQVKNKPIGKYIM+ DGG+WA+				169

SDJCT 108 AINLQWKKLNGVYIKARSGDWLGRIGLIVKGEVVKPKTKYIPNLGGIWD 160

Download GenPept Graphics

Next Previous Descriptions

Chain B, Daae Adhesin

Sequence ID: [pdb|2BCMI6](#) Length: 165 Number of Matches: 1

[See 2 more title\(s\)](#)

Range 1: 34 to 148 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score Expect Method Identities Positives Gaps  
71.2 bits(173) 1e-12 Compositional matrix adjust. 42/116(36%) 62/116(53%) 3/116(2%)

Query 65 TELHRAVLGEVSVSGCGTDQRVAVSAGNFYDGTGFFMTQDGGTKLTAHL-AINGDQ 123  
++L D +G +V+ +GC Q + + YD I +MT KL L AI+G  
Sbjct 34 SKLKDDTAIGVIGVITALGCNGLQALQADPNVDAT-NLYMTRSRNHDKLNKVKLKAIDGSS 92  
Query 124 WKKDNGVYVYRAAGGDWI-VIAIIVRGEQVVKPKTKYIMHPDGGFWANVYRIKIIRS 178  
W NGV+Y+ GG+W + I V G Q +KPIG+YI++ GG+W N +I S  
Sbjct 93 WYVNGVYFKTEGGHGGHVGISVDGNQIDKPTGEYTLNLTGGYWINDNKQIFQAS 148

Related Information

[Structure - 3D structure displays](#)

Download GenPept Graphics

Next Previous Descriptions

fimbrial protein [Escherichia coli KTE216]

Sequence ID: [ref|ZP\\_1973980.1](#) Length: 159 Number of Matches: 1

[See 3 more title\(s\)](#)

Range 1: 54 to 159 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score Expect Method Identities Positives Gaps  
70.9 bits(172) 1e-12 Compositional matrix adjust. 40/107(37%) 59/107(55%) 3/107(2%)

Query 65 TELHRAVLGEVSVSGCGTDQRVAVSAGNFYDGTGFFMTQDGGTKLTAHL-AINGDQ 123  
++L D +G +V+ +GC Q + + YD I +MT KL L AI+G  
Sbjct 54 SKLKDDTAIGVIGVITALGCNGLQALQADPNVDAT-NLYMTRSRNHDKLNKVKLKAIDGSS 112  
Query 124 WKKDNGVYVYRAAGGDWI-VIAIIVRGEQVVKPKTKYIMHPDGGFWAN 169  
W NGV+Y+ GG+W + I V G Q +KPIG+YI++ GG+W N  
Sbjct 113 WYVNGVYFKTEGGHGGHVGISVDGNQIDKPTGEYTLNLTGGYWIN 159

Related Information

Download GenPept Graphics

Next Previous Descriptions

RecName: Full=F1845 fimbrial protein; AltName: Full=Fimbrial adhesin F1845 antigen; Flags: Precursor

Sequence ID: [sp|P13719.1|DAAE\\_ECOLX](#) Length: 159 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 54 to 159 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score Expect Method Identities Positives Gaps  
70.9 bits(172) 2e-12 Compositional matrix adjust. 40/107(37%) 59/107(55%) 3/107(2%)

Query 65 TELHRAVLGEVSVSGCGTDQRVAVSAGNFYDGTGFFMTQDGGTKLTAHL-AINGDQ 123  
++L D +G +V+ +GC Q + + YD I +MT KL L AI+G  
Sbjct 54 SKLKDDTAIGVIGVITALGCNGLQALQADPNVDAT-NLYMTRSRNHDKLNKVKLKAIDGSS 112  
Query 124 WKKDNGVYVYRAAGGDWI-VIAIIVRGEQVVKPKTKYIMHPDGGFWAN 169  
W NGV+Y+ GG+W + I V G Q +KPIG+YI++ GG+W N  
Sbjct 113 WYVNGVYFKTEGGHGGHVGISVDGNQIDKPTGEYTLNLTGGYWIN 159

Related Information

Download GenPept Graphics

Next Previous Descriptions

Dr adhesin [Escherichia coli]

Sequence ID: [gb|ABD93416.1](#) Length: 160 Number of Matches: 1

Range 1: 151 to 159 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score Expect Method Identities Positives Gaps  
69.7 bits(169) 3e-12 Compositional matrix adjust. 44/111(40%) 61/111(54%) 6/111(5%)

Query 62 KRHTELHRAVLGEVSVSGCGTDQRVAVSAG--NFYDGTGFFMTQDGGTKLTAHL-A 118  
K +L D A +G V+V +GC Q VA+ AG NF G F F ++ + KL ++  
Sbjct 51 KTRGQLTDAAFIGPVTVQALGCNARQ-VALKAGIDNFEQKGF-FLISDNNRDKLYVNIIRP 108  
Query 119 TNGDQWKKDNGVYVYRAAGGDWI-VIAIIVRGEQVVKPKTKYIMHPDGGFWA 168  
I+ W DNGV+Y+ G W +I I V G+Q N P G YI+ GG+W A  
Sbjct 109 IDNSAWITINGVYFNVDVGSWGGIIGIYVDGQQINTPFGNYLILITGGYNA 159

Related Information

Download GenPept Graphics

Next Previous Descriptions

DafaE [Escherichia coli]

Sequence ID: [gb|AAK17183.1|AF325672.5](#) Length: 161 Number of Matches: 1

Range 1: 33 to 159 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score Expect Method Identities Positives Gaps  
69.7 bits(169) 3e-12 Compositional matrix adjust. 46/127(36%) 65/127(51%) 7/127(5%)

Query 48 DWSRNNCGGDVAHKRTELHRAV----LGEVSVSGCGTDQRVAVSAG--NFYDGI FG 102  
D + C V K + L V + + + GCGT QRVA+ G YD I G  
Sbjct 33 DLIITEECRVTVESKSESLRSSLVANRHITNLGIQSTGCGTQRVALKLGAGSYDDING 92  
Query 103 FFMIDGGI-KLTAHLAINGDQWKKDNGVYVYRAAGGDWI-VIAIIVRGEQVVKPKTKYIM 160  
MI + GI KL ++ + + +D G V Y Y G+W + I VR +Q + PIKTYI+  
Sbjct 93 ARMHENGIKLLVNMGSATGDGTQDGGVYINRDNWNGQWVFIVRNDQQLFPIKTYIL 152  
Query 161 HPDGGFW 167  
+ +GGFW  
Sbjct 153 NLEGGFW 159

Related Information

Download ▾ GenPept Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Dr adhesin [Escherichia coli]  
Sequence ID: [gb|ABD93380.1](#) Length: 161 Number of Matches: 1  
[▶ See 11 more title\(s\)](#)

Related Information

Range 1: 65 to 159 [GenPept](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
69.3 bits(168)	5e-12	Compositional matrix adjust.	40/95(42%)	55/95(57%)	3/95(3%)
Query 76	VSVSGVCGTIDQRVAVSAG-NFYDGI FGFMIQDGGT-KLIAHLAINGDQWKKDNGVYYR	133			
	++ GCGT QRVA+ G YD I G MI + GT KL ++ +D GVYY				
Sbjct 65	LGIQSTGCGTGRVALKLGAGSYDDINGARHMHENGIDKLLVSMGSATGDGTQDGGVYYI	124			
Query 134	AAGGDWT-VIAIIVRGEQVWPKPTGKYIMHPDGGFW	167			
	G+W + IVR +Q + PTGKYI++ +GGFW				
Sbjct 125	NRDGNWNGQWVFIVRNDQQHLPTGKYITLNLEGGFW	159			

Download ▾ GenPept Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Dr adhesin [Escherichia coli]  
Sequence ID: [gb|ABD93385.1](#) Length: 161 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 65 to 159 [GenPept](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
68.9 bits(167)	6e-12	Compositional matrix adjust.	40/95(42%)	54/95(56%)	3/95(3%)
Query 76	VSVSGVCGTIDQRVAVSAG-NFYDGI FGFMIQDGGT-KLIAHLAINGDQWKKDNGVYYR	133			
	++ GCGT QRVA+ G YD I G MI + GT KL ++ +D GVYY				
Sbjct 65	LGIQSTGCGTGRVALKLGAGSYDDINGARHMHENGIDKLLVSMGSATGDGTQDGGVYYI	124			
Query 134	AAGGDWT-VIAIIVRGEQVWPKPTGKYIMHPDGGFW	167			
	G+W + IVR +Q + PTGKYI++ +GGFW				
Sbjct 125	NRDGNWNGQWVFIVRNDQQHLPTGKYITLNLEGGFW	159			

Download ▾ GenPept Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Dr adhesin [Escherichia coli]  
Sequence ID: [gb|ABD93381.1](#) Length: 161 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 65 to 159 [GenPept](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
68.8 bits(167)	8e-12	Compositional matrix adjust.	40/95(42%)	54/95(56%)	3/95(3%)
Query 76	VSVSGVCGTIDQRVAVSAG-NFYDGI FGFMIQDGGT-KLIAHLAINGDQWKKDNGVYYR	133			
	++ GCGT QRVA+ G YD I G MI + GT KL ++ +D GVYY				
Sbjct 65	LGIQSTGCGTGRVALKLGAGSYDDINGARHMHENGIDKLLVSMGSATGDGTQDGGVYYI	124			
Query 134	AAGGDWT-VIAIIVRGEQVWPKPTGKYIMHPDGGFW	167			
	G+W + IVR +Q + PTGKYI++ +GGFW				
Sbjct 125	NRDGNWNGQWVFIVRNDQQHLPTGKYITLNLEGGFW	159			

Download ▾ GenPept Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

dr-family adhesin [Escherichia coli MS 21-1]  
Sequence ID: [ref|ZP\\_07154171.1](#) Length: 161 Number of Matches: 1  
[▶ See 12 more title\(s\)](#)

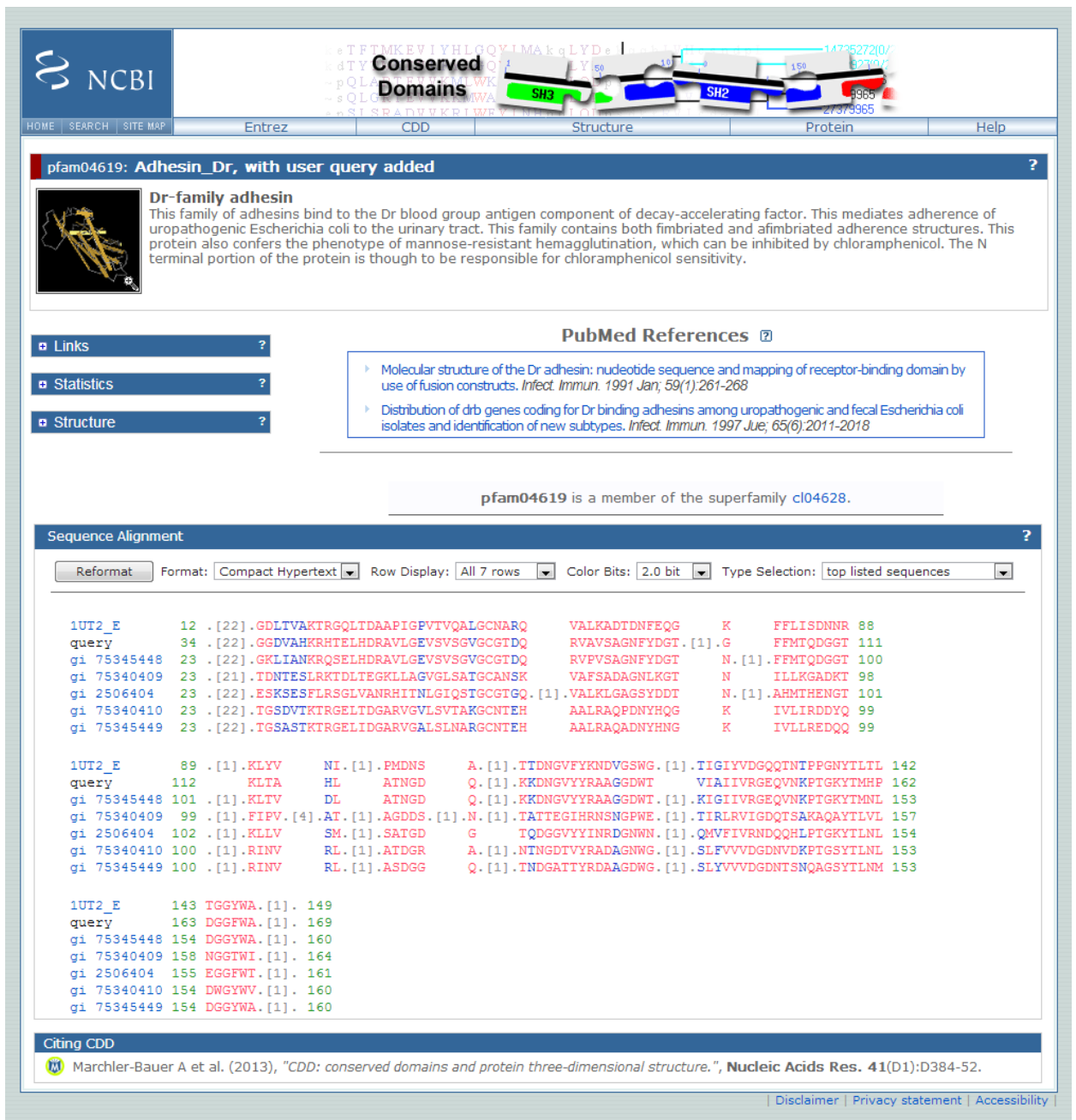
Related Information

Range 1: 65 to 159 [GenPept](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
68.6 bits(166)	8e-12	Compositional matrix adjust.	40/95(42%)	54/95(56%)	3/95(3%)
Query 76	VSVSGVCGTIDQRVAVSAG-NFYDGI FGFMIQDGGT-KLIAHLAINGDQWKKDNGVYYR	133			
	++ GCGT QRVA+ G YD I G MI + GT KL ++ +D GVYY				
Sbjct 65	LGIQSTGCGTGRVALKLGAGSYDDINGARHMHENGIDKLLVSMGSATGDGTQDGGVYYI	124			
Query 134	AAGGDWT-VIAIIVRGEQVWPKPTGKYIMHPDGGFW	167			
	G+W + IVR +Q + PTGKYI++ +GGFW				
Sbjct 125	NRDGNWNGQWVFIVRNDQQHLPTGKYITLNLEGGFW	159			

Loading alignment...

## 14- ANEXO F – Domínio conservado presente na putativa proteína Afa-X e outras proteínas Afa/Dr



**Conserved Domains**

**pfam04619: Adhesin\_Dr, with user query added**

**Dr-family adhesin**  
 This family of adhesins bind to the Dr blood group antigen component of decay-accelerating factor. This mediates adherence of uropathogenic Escherichia coli to the urinary tract. This family contains both fimbriated and afimbriated adherence structures. This protein also confers the phenotype of mannose-resistant hemagglutination, which can be inhibited by chloramphenicol. The N terminal portion of the protein is thought to be responsible for chloramphenicol sensitivity.

**PubMed References**

- Molecular structure of the Dr adhesin: nucleotide sequence and mapping of receptor-binding domain by use of fusion constructs. *Infect. Immun.* 1991 Jan; 59(1):261-268
- Distribution of drb genes coding for Dr binding adhesins among uropathogenic and fecal Escherichia coli isolates and identification of new subtypes. *Infect. Immun.* 1997 Jun; 65(6):2011-2018

pfam04619 is a member of the superfamily cl04628.

**Sequence Alignment**

Reformat: Compact Hypertext | Row Display: All 7 rows | Color Bits: 2.0 bit | Type Selection: top listed sequences

1UT2_E	12	[.22].	GDLTVA	KTRGQLTDAAPIGFVTQALGCNARQ	VALKADTDNFEQG	K	FFLISDNNR	88
query	34	[.22].	GGDVAK	KRHTELHDRVAVLGEVSVSGVCGTDQ	RVAVSAGNFYDGT	[.1].G	FFMTQDGGT	111
gi 75345448	23	[.22].	GKLIANKRQ	SELHDRVAVLGEVSVSGVCGTDQ	RVFVSAGNFYDGT	N.[1].	FFMTQDGGT	100
gi 75340409	23	[.21].	TDNTESLRK	TDLTEGKLLAGVLSATGCANSK	VAFSADAGNLKGT	N	ILLKGADKT	98
gi 2506404	23	[.22].	ESKSES	FLRSGLVANRHITNLGIQSTGCGTGQ	[.1].VALKLGAGSYDDT	N.[1].	AHMTHEGT	101
gi 75340410	23	[.22].	TGSDVT	KTRGELTDGARVGLSVTAKGCNTEH	AALRAQPDNYHQG	K	IVLIRDDYQ	99
gi 75345449	23	[.22].	TGSAST	KTRGELIDGARVGLSLNARGCNTEH	AALRAQADNYHNG	K	IVLLREDQQ	99

1UT2_E	89	[.1].	KLYV	NI.[1].	PMDNS	A.[1].	TTDNGV	FYKNDVGSWG	[.1].	TIGIYVDG	QQINI	PPGNY	LTIL	142			
query	112		KLTA	HL	ATNGD	Q.[1].	KKDNGV	YYRAAGGDWT		VIAIIVR	GEQV	NKPTG	KYTMHP	162			
gi 75345448	101	[.1].	KLTV	DL	ATNGD	Q.[1].	KKDNGV	YYRAAGGDWT	[.1].	KIGIIVR	GEQV	NKPTG	KYTMNL	153			
gi 75340409	99	[.1].	FIPV	[4].	AT.[1].	AGDDS	[.1].	N.[1].	TATTEGI	HRNS	NGPWE	[.1].	TIRLRV	IGDQ	TSAKA	QAYTLV	157
gi 2506404	102	[.1].	KLLV	SM.[1].	SATGD	G	TQDGGV	YYINRDGNWN	[.1].	QMVFI	VRND	QQHL	PTGKY	TLNL	154		
gi 75340410	100	[.1].	RINV	RL.[1].	ATDGR	A.[1].	NTNGDT	VYRADAGNWG	[.1].	SLFVV	VGDG	NVDR	KPTGS	YTLNL	153		
gi 75345449	100	[.1].	RINV	RL.[1].	ASDGG	Q.[1].	TNDGAT	TYRDAAGDWG	[.1].	SLYVV	VVDG	NDTNS	QAGS	YTLNM	153		

1UT2_E	143		TGGYWA	[.1].	149
query	163		DGGFWA	[.1].	169
gi 75345448	154		DGGYWA	[.1].	160
gi 75340409	158		NGGTWI	[.1].	164
gi 2506404	155		EGGFWT	[.1].	161
gi 75340410	154		DWGYNV	[.1].	160
gi 75345449	154		DGGYWA	[.1].	160

**Citing CDD**  
 Marchler-Bauer A et al. (2013), "CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure.", *Nucleic Acids Res.* 41(D1):D384-52.

[Disclaimer](#) | [Privacy statement](#) | [Accessibility](#)

- Obs.: 1UT2\_E : Afa-III  
 gi 75345448: DrbE-121  
 gi 75340409: Afa-II  
 gi 2506404: Afa-I  
 gi 75340410: Afa-V  
 gi 75345449: DrbE-122



## **15- ANEXO G – Artigo originado a partir deste trabalho**

As páginas a seguir apresentam o conteúdo do artigo originado a partir deste trabalho, publicado no periódico *BMC Microbiology*, de acesso livre, em 01 de fevereiro de 2013, doi:10.1186/1471-2180-13-22.