

Márcio Mandelli Lorenzoni

**CARACTERIZAÇÃO DE PROVÁVEIS GENES DO
SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III EM
ESCHERICHIA COLI DE ADESÃO DIFUSA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Co-Orientadora: Prof. Dr. Cynthia Maria Kyaw

Brasília, julho de 2009

Dedico

Aos meus pais, a Dinda e a Saráí que
devem estar tão felizes quanto eu pela
conquista desta etapa na minha vida.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por tornar as coisas sonhadas, possíveis.

Aos meus pais por terem me dado além de amor, carinho e educação, todas as oportunidades possíveis para chegar onde estou.

À Dinda por toda sua fé, amor, carinho e dedicação incondicionais.

Às minhas irmãs pela amizade, companheirismo e por toda ajuda profissional gratuita hehehe!

À minha família como um todo pela compreensão, apoio e carinho nos momentos de nervosismo e estresse.

À minha LOVÃO, Sarai A. Pasqualotto por toda paciência, compreensão, perseverança, companheirismo, amor e seu alto-astrol praticamente inabalável. Te amo!

Ao Professor Marcelo de Macedo Brígido por esta oportunidade.

Agradeço especialmente à professora Cynthia M. Kyaw por desde os tempos de graduação ter acreditado e apostado na minha capacidade, pela amizade, apoio e pelo precioso conhecimento compartilhado.

Aos amigos e companheiros de bancada Gustavo Balduino Leite e Marina Heckmann Bove, por todos os bons momentos e por toda a disponibilidade e apoio para os experimentos.

À equipe do Laboratório de Microbiologia, Prof^a. Loreny G. Giugliano, Prof^a. Beatriz, Alex, Lilian, técnicos e estagiários por toda ajuda.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular, professora Ildinete Silva Pereira por ceder espaço e materiais do Lab.4, aos alunos Eveline Tavares, Marciano, Thiago e por toda ajuda e disponibilidade e ao pessoal do seqüenciamento.

Ao pessoal da Secretaria da Pós Graduação em Patologia Molecular, Alessandro, Daniele e Jaqueline.

Ao Horácio por toda a ajuda com o Clustal W.

Aos meus queridos amigos André e Renata, Cesar Augustus, Claudia Jardim, Élcio e Carmosina, Felipe Tironi, Hélio e Tayane, Inara Gomes Vieira, Lauro Pain Romera e Marcelo Encinas, por estarem presentes na minha vida.

Ao Professor Carlos Eduardo Tosta por me apresentar o caminho da meditação e do amorecimento.

Ao Dr. Rômulo Marocco Filho, Dr. Anderson Silvestrini, toda equipe da radioterapia do Hospital Santa Lúcia com a Dra. Marília Rezende e todos os enfermeiros e técnicos, pelo restabelecimento da minha saúde.

Aos colegas da DRE do Paranoá por todo apoio e liberações.

MUITO OBRIGADO!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.
(José de Alencar)

Sumário

Lista de Abreviaturas	viii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
Introdução	16
<i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas	16
Classificação e características	17
Organização geral da PAI LEE	21
O Sistema de Secreção do Tipo Três	23
O patotipo DAEC	27
Objetivos	29
Materiais e Métodos	30
1. Linhagens bacterianas	30
2. Plasmídeos	31
3. Meios de cultura	31
4. Soluções, tampões e enzimas	31
5. Kits utilizados	34
6. Cultivo e manutenção das linhagens bacterianas	35
7. Extração de DNA total para a realização de experimentos de PCR	35
8. Extração de DNA Plasmidial	36
9. Extração de RNA total	37
10. Tratamento do RNA total com DNase I livre de RNase	38
11. Condições empregadas nos experimentos de PCR para a amplificação de genes do TTSS.	38
12. Condições empregadas nos experimentos de RT- PCR para análise da expressão de genes do TTSS.	40
13. Clonagem dos produtos amplificados pelos pares de iniciadores específicos no vetor p GEM-T	42
14. Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico	42
15. Seqüenciamento automático dos produtos de PCR e dos plasmídeos contendo os produtos das PCR's e análise das seqüências geradas	43
Resultados e Discussão	45
1. Definição dos genes TTSS e escolha das amostras de DAEC	45
2. Padronização das condições empregadas na PCR	47
3. Isolamento e caracterização de prováveis genes TTSS	47
3.1. Detecção e caracterização da provável rorf1 de DAEC	47
3.1.1. Experimentos de PCR	48
3.1.2. Seqüenciamento dos produtos de PCR	49

3.2. Detecção e caracterização da possível orf2 e do provável gene <i>cesAB</i>	54
3.2.1. Experimentos de PCR	54
3.2.2. Seqüenciamento e caracterização dos produtos da PCR	56
3.3. Detecção e caracterização dos prováveis genes <i>escR</i> e <i>escT</i> e <i>sepQ</i>	58
3.3.1. Experimentos de PCR	59
3.3.2. Seqüenciamento e caracterização dos produtos de PCR	63
3.3.2.1. Provável gene <i>escR</i>	63
3.3.2.2. Provável gene <i>escT</i>	65
3.3.2.3. Provável gene <i>sepQ</i>	69
4. Ensaio para expressão dos prováveis genes do TTSS de DAEC	72
4.1. Indução da expressão dos prováveis genes do TTSS de DAEC	72
4.2. Análise da expressão dos prováveis genes do TTSS de DAEC em condições de indução	75
4.3. Análise da expressão dos prováveis genes do TTSS de DAEC na ausência de condições de indução	82
Conclusões e Perspectivas	85
Referências Bibliográficas	87

Lista de Abreviaturas

ATP – Adenosina trifosfato

CA – Complexo agulha

DA - Adesão difusa

DAEC – *Escherichia coli* de adesão difusa

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxinucleotídeo 5'-trifosfato

EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EHEC – *Escherichia coli* entero-hemorrágica

EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasiva

EPEC – *Escherichia coli* de adesão localizada

ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

LEE – *Locus of enterocyte effacement*

ORF – Fase de leitura aberta (do inglês, *open reading frame*)

PAI – Ilha de patogenicidade (do inglês, *patogenicity island*)

PCR – Reação de polimerização em cadeia

RNA – Ácido ribonucléico

RNAse – Ribonuclease

RT- Transcrição reversa

SDS – Sódio dodecil sulfato

STEC – *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga

Tris – Tri(hidroximetil)aminimetano

TTSA – Aparato de Secreção do Tipo Três (do inglês, *Type Three Secretion Aparatus*)

TTSS – Sistema de Secreção do Tipo Três (do inglês, *Type Three Secretion System*)

UPEC – *Escherichia coli* uropatogênica

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D galactopiranosídeo

Unidades

°C – Graus Celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

ng – Nanograma

g – Força gravitacional

kb – kilobases

kDa – Kilodalton

kV – Kilovolts

L – Litro

M – Molar

min – Minutos

mL – Mililitro

MM – Massa molecular

mM – Milimolar

OD550 – Densidade ótica a 550nm

p/v – peso/volume

pb – Pares de bases

pH – Potencial hidrogeniônico

rpm – rotações por minuto

U – Unidade enzimática

v – Volume

v/v – volume/volume

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da interação dos seis tipos de <i>E. coli</i> causadoras de diarreia, com a célula alvo típica.	18
Figura 2. Organização estrutural dos genes da ilha LEE de EPEC/EHEC.	22
Figura 3. Representação esquemática do Aparato de Secreção Tipo Três de <i>E. coli</i> .	24
Figura 4. Representação do complexo agulha de <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Shigella</i> .	26
Figura 5. Esquema da ilha LEE de <i>E. coli</i> 2348/69, ilustrando os genes para os quais novos iniciadores foram sintetizados.	45
Figura 6. Esquema das seqüências relativas à <i>rorf1</i> , <i>orf2/cesAB</i> , <i>escR</i> , <i>escT</i> e <i>sepQ</i> , com suas regiões flangeadoras em EPEC E2348/69.	46
Figura 7. (A) Diagrama esquemático da <i>rorf1</i> e suas regiões flangeadoras em EPEC E2348/69.	49
Figura 8. (A) Perfil eletroforético do DNA plasmidial purificado a partir dos clones transformantes contendo fragmento de DNA correspondente da amostra C39 e (B) da PCR empregando o DNA plasmidial e os iniciadores universal e reverso.	50
Figura 9. Alinhamento múltiplo entre as seqüências nucleotídicas da <i>rorf1</i> de REPEC O103:H2, EPEC O111:H ⁻ , EPEC E2348/69 e os fragmentos de DNA obtidos a partir da amplificação do DNA das amostras C39 e C74.	53
Figura 10. (A) Diagrama da <i>orf2/cesAB</i> com suas regiões flangeadoras em EPEC E2348/69.	55
Figura 11. (A) Perfil eletroforético do DNA plasmidial purificado a partir dos clones transformantes contendo fragmento de DNA correspondente da amostra C39 e (B) da PCR empregando o DNA plasmidial e os iniciadores universal e reverso.	56
Figura 12. Alinhamento múltiplo entre as seqüências nucleotídicas relativas à <i>orf2/cesAB</i> de STEC O26:H-, EPEC O111:H-, EPEC E2348/69, <i>Citrobacter rodentium</i> e os fragmentos de DNA obtidos a partir da amplificação do DNA das amostras C39 e C74.	58

Figura 13. Representação esquemática do aparato de secreção do tipo três de EPEC e EHEC. Localização das proteínas EscR, EscS, EscT e SepQ na região basal do aparato.	59
Figura 14. Diagrama esquemático dos genes <i>escR</i> e <i>escT</i> e suas regiões flanqueadoras em EPEC E2348/69.	60
Figura 15. Análise eletroforética dos produtos de PCR em gradiente de temperatura, empregando os iniciadores RST3 for/ <i>escR</i> rev (A) e <i>escT</i> for/RST4 rev, a partir do DNA extraído da amostra C74(B).	61
Figura 16. Diagrama esquemático do gene <i>sepQ</i> e suas regiões flanqueadoras em EPEC E2348/69.	62
Figura 17. (A) Perfil eletroforético do DNA plasmidial purificado a partir dos clones transformantes contendo fragmento de DNA correspondente da amostra C39 e (B) da PCR empregando o DNA plasmidial, e os iniciadores universal e reverso.	63
Figura 18. Alinhamento múltiplo entre a proteína <i>escR</i> de EPEC O111:H-, STEC O26:H-, REPEC O15:H- e EPEC E2348/69 e a proteína predita do provável gene <i>escR</i> das amostras C39 e C74.	65
Figura 19. (A) Perfil eletroforético do DNA plasmidial purificado a partir dos clones transformantes contendo fragmento de DNA correspondente da amostra C39 e (B) da PCR empregando o DNA plasmidial e os iniciadores universal e reverso.	66
Figura 20. Alinhamento múltiplo entre as sequências nucleotídicas do gene <i>escT</i> de EPEC O111:H-, STEC O26:H-, EPEC E2348/69 e os fragmentos de DNA obtidos a partir da amplificação do DNA das amostras de DAEC C39 e C74.	68
Figura 21. (A) Perfil eletroforético do DNA plasmidial purificado a partir dos clones transformantes contendo fragmento de DNA correspondente da amostra C39 e (B) da PCR empregando o DNA plasmidial e os iniciadores universal e reverso.	69
Figura 22. Alinhamento múltiplo entre as sequências relativas ao gene <i>sepQ</i> de EPEC O111:H-, STEC O26:H-, EPEC E2348/69 e os fragmentos de DNA obtidos a partir da amplificação das amostras de DAEC C39 e C74.	71
Figura 23. Perfis eletroforéticos dos RNAs extraídos das amostras de DAEC C39 e C74 e dos controles positivos EHEC EDL933 e EPEC E2348/69.	73

Figura 24. Perfil eletroforético dos produtos amplificados pelo par de iniciadores N1/N2, empregando como molde os RNAs das amostras DAEC C39 e C74, EHEC EDL933 e EPEC E2348/69, extraídos nos cinco tempos de indução.	74
Figura 25. Perfil eletroforético dos produtos amplificados pelo par de iniciadores N1/N2, a partir do cDNA das amostras EHEC, EPEC, C39 e C74 nos diferentes tempos de indução.	76
Figura 26. Perfil eletroforético dos produtos amplificados pelo par de iniciadores escR rev/RST3 a partir do cDNA das amostras controle EHEC, EPEC e das amostra C39 e C74 nos diferentes tempos de indução.	77
Figura 27. Perfil eletroforético dos produtos amplificados pelo par de iniciadores GAP F e GAP R a partir do cDNA da amostra controle EPEC e das amostras C39 e C74 nos diferentes tempos de indução.	78
Figura 28. Perfil eletroforético dos produtos amplificados pelo par de iniciadores N1 e N2 a partir do cDNA da amostra controle EPEC e das amostras C39 e C74 nos diferentes tempos de indução.	79
Figura 29. Perfil eletroforético dos produtos amplificados pelo par de iniciadores RST3 / escR rev a partir do cDNA da amostra controle EPEC e das amostras C39 e C74 nos diferentes tempos de indução.	80
Figura 30. Perfil eletroforético dos produtos amplificados pelo par de iniciadores orf2 for / cesAB rev a partir do cDNA da amostra controle EPEC e das amostras C39 e C74 nos diferentes tempos de indução.	81
Figura 31. Perfil eletroforético dos produtos amplificados pelo par de iniciadores escT for / RST4 a partir do cDNA da amostra controle EPEC e das amostras C39 e C74 nos diferentes tempos de indução.	82
Figura 32. Perfil eletroforético dos produtos amplificados pelo par de iniciadores orf2 for / cesAB rev, RST3 for / escR rev, escT for / RST4 a partir do cDNA da amostra controle EPEC e das amostras C39 e C74 nos diferentes tempos de indução.	83
Figura 33. . Perfil eletroforético dos produtos amplificados pelo par de iniciadores GAP F/ GAP R a partir do cDNA da amostra controle EPEC e das amostras C39 e C74 no tempo zero de indução.	84

Índice de Tabelas

Tabela 1. Seqüências iniciadoras empregadas nos ensaios de PCR.	39
Tabela 2. Características das amostras de DAEC selecionadas.	47
Tabela 3. Análise de similaridade dos fragmentos de DNA gerados pelo par de iniciadores rorf1 for/ rorf1 rev.	52
Tabela 4. Análise de similaridade dos fragmentos de DNA gerados pelo par de iniciadores ORF2/cesAB.	57
Tabela 5. Análise de similaridade dos fragmentos de DNA gerados pelo par de iniciadores RST3 for/ escR rev.	64
Tabela 6. Análise de similaridade dos fragmentos de DNA gerados pelo par de iniciadores escT for/ RST4 rev.	67
Tabela 7. Análise de similaridade dos fragmentos de DNA gerados pelo par de iniciadores sepQ for/ sepQ rev.	70

Resumo

As *Escherichia coli* de adesão difusa (DAEC) correspondem a um grupo heterogêneo e pouco caracterizado quando comparado aos demais patótipos de *E. coli*. O fato de algumas linhagens descritas serem patogênicas e outras não geram dúvidas sobre a classificação precisa deste grupo. Contribui para isso, o fato de ainda não existir qualquer marcador molecular específico para genes de virulência de DAEC. Alguns patógenos da mucosa intestinal fazem uso do Sistema de Secreção Tipo Três (TTSS) para a injeção de proteínas efetoras em células alvo. Neste trabalho, utilizando linhagens de DAEC isoladas de crianças diarreicas do DF, realizamos experimentos de PCR com iniciadores definidos a partir de genes do TTSS da linhagem E23468/69 de EPEC. Assim, foram sintetizados iniciadores dirigidos às seqüências *rorf1*, *cesAB*, *escR*, *escT* e *sepQ*. Análises de similaridade revelaram escores de até 100% entre alguns dos produtos obtidos e linhagens de EPEC, EHEC, STEC. Foi possível identificar o fragmento de DNA referente ao provável gene *escR* completo, bem como de seqüências de DNA extremamente conservadas da *rorf1*, *cesAB*, *escT* e *sepQ*. Os produtos das ampliações correspondentes aos prováveis genes do TTSS foram clonados, para a criação de um banco de seqüências, visando futuras análises. Devido ao êxito na detecção de alguns prováveis genes do TTSS em nossas amostras e, uma vez que a expressão de genes do TTSS ainda não foi relatada em DAEC, experimentos visando analisar a expressão desses prováveis genes foram realizados por meio de RT-PCR, empregando RNA isolado de linhagens de DAEC em culturas submetidas a condições de indução dos genes do TTSS. Tal abordagem nos permitiu demonstrar que houve transcrição dos prováveis genes *escN*, *escR* e *escT*, apesar dos resultados divergirem um pouco em relação às amostras e genes testados. Nossas análises indicaram claramente a presença e a expressão dos prováveis genes do TTSS em duas das amostras de DAEC analisadas. Estudos complementares deverão ser realizados a fim de avaliarmos a funcionalidade deste sistema de secreção e os resultados obtidos certamente contribuirão na elucidação dos mecanismos de virulência deste ainda controverso patótipo.

Abstract

The diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC) is a heterogeneous group and less characterized when compared to other pathotypes of *E. coli*. The fact that some strains are pathogenic and others not, creates doubts about the exact classification of this group. Contributes to it, the lack of molecular markers corresponding to the virulence genes of DAEC. Some intestinal pathogens use the Type Three Secretion System (TTSS) to inject effector proteins into target cells. In this study, using strains of DAEC originated from diarrheic children of DF, we performed PCR experiments employing primers based on genes of the TTSS of EPEC strain E23468/69, directed to the sequences *rorf1*, *cesAB*, *escR*, *escT* and *sepQ*. DNA analyses revealed similarity scores of 100% between some of the products and EPEC, EHEC and STEC strains. It was possible to detect the presence of a DNA fragment corresponding to the complete *escR* gene, as well as highly conserved DNA sequences homologous to *rorf1*, *cesAB*, *escT*, and *sepQ*. The amplification products corresponding to the probable TTSS genes were cloned in order to create a database of sequences, to be submitted to further analyses. The success obtained in detecting probable TTSS genes in our samples and, since the expression of genes of the TTSS has not yet been reported in DAEC, experiments were performed in order to examine the expression of these candidate genes by means of RNA extraction and reverse transcription procedures of cultures grown under TTSS genes induction conditions. This approach allowed us to conclude that the *escN*, *escR* and *escT* genes were transcribed, although the results differ somewhat among the samples and genes tested. Our analyses clearly showed the presence and expression of TTSS genes in two samples of DAEC. Additional studies should be conducted to assess the functionality of this secretion system, and the results certainly help in elucidating the mechanisms of virulence of this still controversial pathotype.

Introdução

***Escherichia coli* diarreio gênicas**

Escherichia coli, um bacilo Gram negativo membro da família *Enterobacteriaceae*, são as bactérias anaeróbicas facultativas mais abundantes da microbiota intestinal colonizando normalmente a camada mucosa do cólon de maneira comensal (Garmendia *et al.*, 2005). Todavia, destacam-se como um dos principais agentes etiológicos das diarreias bacterianas em humanos, sendo outros mamíferos como bovinos, suínos e coelhos, hospedeiros sintomáticos ou não desses microrganismos (Prescott, 1978; Lage *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 1996; Coia, 1998; Chapman *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2006). Frequentemente estão relacionadas a surtos de infecção gastrointestinal tanto em países em desenvolvimento (Bhan *et al.*, 1989; Girón *et al.*, 1991b) como em países desenvolvidos (Ryley *et al.*, 1983; Nataro & Kaper, 1998; Knutton *et al.*, 2001), de maneira que o estudo de linhagens patogênicas de *E. coli* é de grande importância médica e até mesmo comercial.

A maioria das linhagens de *E. coli* não são patogênicas pois não possuem genes de virulência. Porém, algumas linhagens apresentam potencial patogênico, podendo promover processos patológicos entéricos de diferentes graus de severidade em seus hospedeiros (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2006). Esse variado perfil patogênico pode causar uma grande variedade de doenças incluindo diarreias, disenteria, síndrome da uremia hemolítica, infecções renais, pneumonia, meningite e septicemia, levando muitas vezes o hospedeiro à morte (revisado por Kaper *et al.*, 2004). Assim torna-se necessário distinguir e entender porque diferentes linhagens de *E. coli* podem causar diferentes tipos de doenças e outras não.

A classificação das *E. coli* tornou-se então um tema recorrente em muitos trabalhos e diversos critérios podem ser usados, de forma que ainda não há um consenso.

Um critério historicamente utilizado e importante ainda hoje, consiste em um sistema de classificação baseado na identificação de antígenos de superfície O (somáticos), flagelares (H) e capsulares (K), permitindo assim reunir linhagens de *E. coli* em sorogrupos e sorotipos, embora tais antígenos não sejam necessariamente os únicos responsáveis pela virulência de certas linhagens (revisado por Nataro & Kaper, 1998).

Outra metodologia empregada na identificação de *E. coli* patogênicas, consiste na verificação do padrão de adesão das bactérias a culturas de tecido (Cravioto *et al.*, 1979; Donnenberg *et al.*, 1997). Tal abordagem permite a identificação de três padrões de adesão: agregativo, localizado e difuso. A produção de toxinas, capacidade de invasão, tipos de lesão celular decorrentes do processo infeccioso (Scaletsky *et al.*, 1984; Cravioto *et al.*, 1991) também são usados adicionalmente na identificação. Por fim, pelo uso de diversas técnicas de biologia molecular, passou-se também a analisar a presença de genes codificadores dos diferentes fatores de virulência presentes nas várias linhagens patogênicas de *E. coli*.

Concomitantemente a esses estudos, diversas propostas de classificação surgiram na literatura e, tendo em vista que a classificação proposta por Levine 1987; Nataro *et al.*, 1987; Levine *et al.*, 1988, revisado por Kaper (1998) é amplamente aceita e empregada na literatura, também será adotada ao longo desse trabalho.

Classificação e características

As *E. coli* diarreiogênicas podem ser classificadas em seis diferentes grupos de patogenicidade (figura 1), também denominados virotipos ou patotipos:

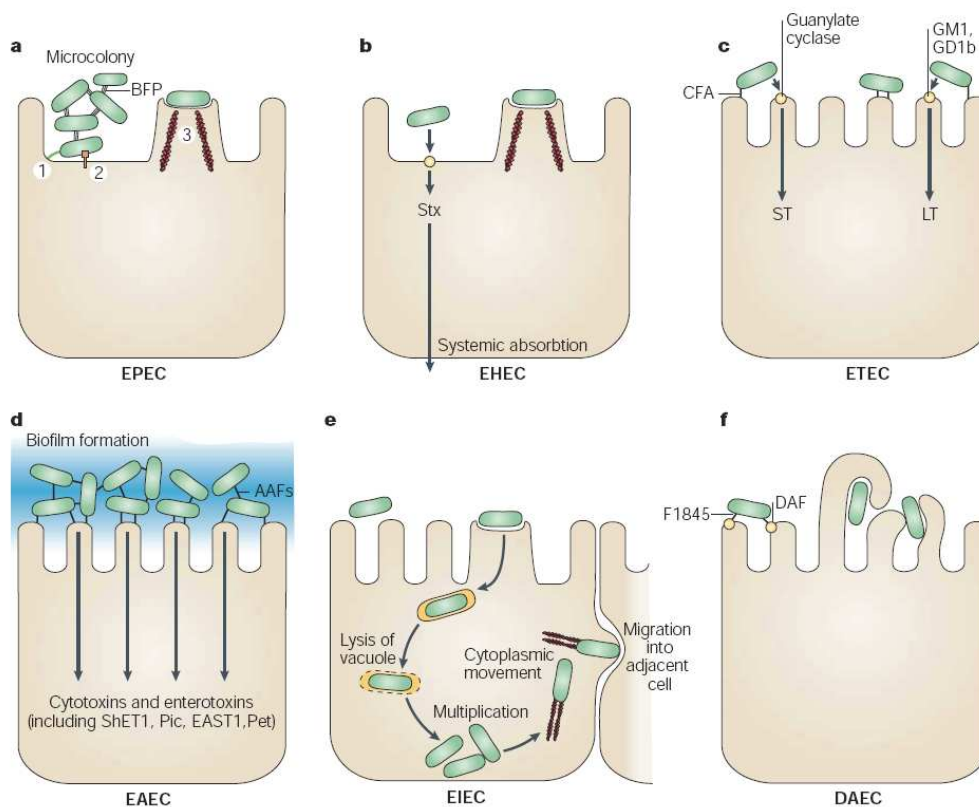


Figura 1. Representação esquemática da interação dos seis tipos de *E. coli* causadoras de diarreia com a célula alvo típica. a. EPEC adere ao enterócito, destruindo as microvilosidades e induzindo a lesão A/E. **b.** EHEC também induz a lesão A/E, mas também é produtora da toxina Stx. **c.** ETEC ao se aderir induz diarreia aquosa pela produção das enterotoxinas (LT) e/ou (ST). **d.** EAEC adere ao epitélio intestinal com formação de biofilme e ainda possui enterotoxinas e citotoxinas. **e.** EIEC invade as células epiteliais, lisa o fagossomo e move-se usando microfilamentos de actina, migrando para as células adjacentes. **f.** DAEC promove eventos de transdução de sinal que resultam na formação de projeções celulares que envolvem a bactéria. AAF, Fimbria de aderência agregativa; BFP, pilus que forma feixes; CFA, antígeno fator de colonização; DAF, fator de aceleração de decaimento; EAST1, *E. coli* enteroagregativa ST1; LT, enterotoxina termolábil; ShET1, enterotoxina 1 de *Shigella*; ST, enterotoxina termoestável. (fonte: Kaper *et al.*, 2004).

As ETEC (*E. coli* enterotoxigênicas), são caracterizadas por produzirem dois tipos de enterotoxinas: termolábil (LT) e termoestável (ST) codificadas por um plasmídeo denominado ENT. Estão relacionadas a surtos em animais (Blanco *et al.*, 1996) e em humanos (Wolf, 1997). Também possuem a fimbria CFS (fator de colonização), relacionada à virulência.

STEC (*E. coli* produtoras de toxina Stx) destacam-se por produzirem as toxinas Stx1 e ou Stx2, também denominadas verotoxinas (VT1 e VT2). Sua virulência causa desde diarréias brandas até colites hemorrágicas (diarréia sanguinolenta), sendo o grupo causador dessa forma severa de diarréia denominado EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica) (revisado por Kaper *et al.*, 2004).

EAEC (*E. coli* enteroagregativas), conhecidas por expressar um padrão de adesão semelhante a tijolos empilhados (Cravioto *et al.*, 1991), possuem como fatores de virulência a toxina EAST1 (Menard & Dubreuil, 2002), as serino-proteases Pic e Pet e diferentes adesinas (Henderson *et al.*, 1999). Formam biofilme e são responsáveis por uma diarréia aquosa persistente em crianças.

EIEC (*E. coli* enteroinvasivas), possuem um mecanismo de ação idêntico a *Shigella*, sendo capazes de invadir e destruir o epitélio do cólon e causar lesões ulcerativas e forte reação inflamatória ao se deslocarem para as células epiteliais adjacentes. Possuem o plasmídeo pINV e os genes *ipaC* e *sen* relacionados à virulência.

DAEC (*E. coli*, de adesão difusa), são relatadas de maneira controversa na literatura. Até o momento é o grupo menos estudado, de modo que sua classificação baseia-se principalmente no padrão de adesão difusa. Estas colonizam a superfície das células HEp-2 e não formam microcolônias como as EPEC (Scaletsky *et al.*, 1984). Assim linhagens de EPEC atípicas freqüentemente são tratadas como DAEC uma vez que seus fatores de virulência são poucos conhecidos. Por se tratar do nosso objeto de estudo, este patotipo será melhor detalhado em uma seção específica.

EPEC (*E. coli* enteropatogênicas), é o grupo mais amplamente estudado e foi utilizado como modelo neste trabalho. São o principal agente de diarréias infantis em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento (Nataro & Kaper, 1998). Este grupo apresenta um padrão de adesão localizada, devido à presença de uma adesina denominada intimina, que promove a adesão íntima aos enterócitos humanos. O plasmídeo EAF, o qual contém o operon *bfp* (“*bundle forming pilus*”), codifica uma fímbria do tipo IV essencial ao fenótipo de adesão localizada (Girón *et al.*, 1991a). Porém, a característica mais marcante desse grupo é a lesão típica que causam após aderirem aos enterócitos, denominada

lesão A/E de “attaching and effacing”, que resulta em uma destruição e achatamento das microvilosidades, decorrentes do rearranjo do citoesqueleto das células hospedeiras (Moon *et al.*, 1983; Jerse *et al.*, 1990; Donnenberg *et al.*, 1993). Vale ressaltar que a lesão A/E não é exclusiva de EPEC sendo também observada em EHEC e em outros gêneros como *Citrobacter rodentium* (Deng *et al.*, 2004). Os genes de virulência deste patotipo encontram-se associados predominantemente a uma ilha de patogenicidade (PAI).

As PAIs foram primeiramente descritas nos anos 80 em uma linhagem uropatogênica de *E. coli* (revisado por Schmidt & Hansel, 2004), sendo posteriormente detectadas em outros patógenos humanos, de animais e também de plantas (McDaniel *et al.*, 1995; Jarvis & Kaper, 1996; Swenson *et al.*, 1996; Hueck, 1998; Lindsay *et al.*, 1998; Chakraborty *et al.*, 2000; Fleckenstein *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001). Segundo Hacker e Kaper (2000) e revisado por Schmidt & Hansel (2004), pode-se listar várias características em comum entre as PAIs: portam um ou mais genes relacionados à virulência; são encontradas apenas em linhagens patogênicas, não sendo detectadas em linhagens não patogênicas de uma espécie ou de espécies estreitamente relacionadas; consistem em regiões genômicas relativamente grandes (10 a 200 kb); apresentam diferenças no conteúdo de G+C em relação ao restante do genoma; freqüentemente estão localizadas adjacentes a genes de tRNA, o que contribui para a hipótese dos genes de tRNA atuarem como sítio de ancoragem de DNA exógeno adquirido por transferência horizontal de genes; são freqüentemente associadas a elementos genéticos móveis como integrases, transposases e IS (seqüências de inserção) e também são flanqueadas por repetições diretas que atuam como seqüências de reconhecimento de enzimas envolvidas em processos de excisão ou inserção de DNA; podem muitas vezes ser instáveis, sendo deletadas ou ainda mobilizadas por bacteriófagos e ainda podem ser encontradas em plasmídeos.

Por codificarem fatores de virulência como adesinas, toxinas, invasinas, sistemas de secreção de proteínas entre outros, o estudo das PAIs vem contribuindo positivamente para a caracterização da patogenicidade de diversas espécies de bactérias.

McDaniel e colaboradores, em 1995, conferiram a denominação LEE (do inglês, *locus of enterocyte effacement*) à ilha de patogenicidade de EPEC. Esta possui os genes *eae*, que codifica a intimina, responsável pela aderência íntima ao enterócito, *tir*, que codifica o receptor de intimina, e uma série de outros genes relacionados à regulação, síntese e secreção de proteínas efetoras.

A denominação LEE também é utilizada para as PAIs de outras bactérias causadoras de lesão A/E (Perna *et al.*, 1998; An *et al.*, 2000; Tauschek *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2004). Diversos estudos compararam ilhas de patogenicidade no intuito de elucidar suas características e grau de conservação dos genes, e descobriu-se que muitos genes contidos em LEE codificam uma estrutura supramolecular denominada Aparato de Secreção do Tipo Três (TTSA, do inglês, *Type Three Secretion Aparatus*), que será detalhado mais a frente.

Organização geral da ilha de patogenicidade LEE

Elliott e colaboradores, em 1998, pelo seqüenciamento completo da LEE de EPEC E2348/69, observaram que região possui 35,6 kb, e contém 41 ORFs preditas distribuídas em pelo menos cinco operons policistrônicos denominados LEE1, LEE2, LEE3, LEE5 e LEE4, como ilustrado na figura 2.

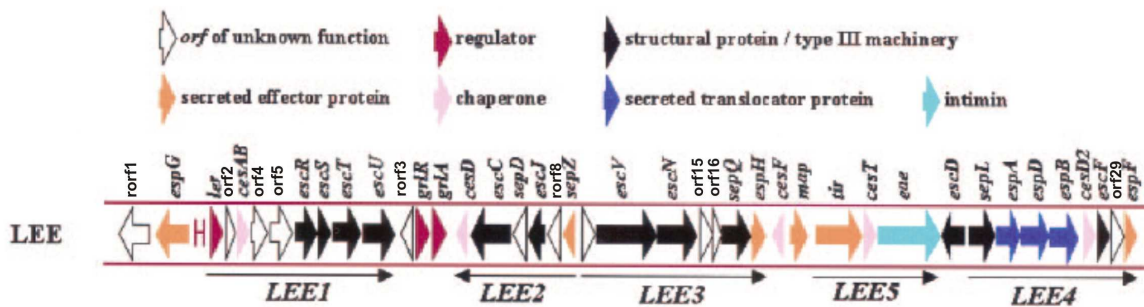


Figura 2. Organização estrutural dos genes da ilha LEE de EPEC/EHEC. As 41 ORFs preditas desta ilha encontram-se esquematizadas. A orientação das setas refere-se ao sentido de transcrição dos genes em relação ao gene *eae*, situado no operon LEE5 (Adaptado de Garmendia *et al.*, 2005).

A localização cromossomal de LEE varia entre as diversas linhagens de EPEC e EHEC, sugerindo eventos de aquisição múltipla durante a evolução desses patógenos (Wieler *et al.*, 1997; Garmendia *et al.*, 2005; Ogura *et al.*, 2008).

Apesar do seqüenciamento da Ilha LEE de diversos organismos, alguns de seus genes ainda não possuem função determinada. Entretanto, pode-se dividir o LEE em regiões funcionais (Elliot *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001; Dahan *et al.*, 2004): no operon LEE5 estão contidos alguns importantes genes de virulência descritos para EPEC e EHEC, o gene *eae* que codifica a intimina, o gene *tir*, receptor de intimina e o gene *cesT* que codifica uma chaperona responsável pela translocação de Tir. Os operons LEE1, LEE2, LEE3 e LEE4, contêm os genes responsáveis pela síntese, secreção e regulação das proteínas que irão formar o TTSS. A estrutura multiproteica formada pelas diversas proteínas secretada pelo TTSS pode ser denominada TTSA (aparato de secreção do tipo três). Os genes presentes na LEE de EPEC e EHEC, cujas funções foram determinadas, receberam denominações de acordo com uma nomenclatura baseada em achados experimentais e funções preditas observadas, ou ainda por homologia, tendo principalmente como modelo *Yersinia* spp. (Elliot *et al.*, 1998; Cheng & Schneewind, 2000; Aizawa, 2001; Clarke *et al.*, 2003). Genes que codificam proteínas secretadas receberam o prefixo genérico *esp*, de *E. coli* secreted proteins. Componentes do aparato de secreção receberam o prefixo *Esc*, de *E. coli* secretion component. A partir de novos estudos, os genes e proteínas vêm

sendo nomeados ou renomeados de acordo com essa convenção, mas há ainda outras nomenclaturas baseadas em propriedades funcionais como: Ces, para as chaperonas (*chaperone encoded secretion*), Ler (*Lee encoded regulator*) Grl (*Global regulator of LEE*).

O Sistema de Secreção do Tipo Três

O Sistema de Secreção do Tipo Três (TTSS, do inglês, *Type Three Secretion System*) é essencial à patogenicidade de uma ampla gama de bactérias de animais e plantas como *Bordetella bronchiseptica*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia pitsitacii*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia caryophylli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium* spp., *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Xanthomonas campestris*, *Yersinia* spp., além das *E. coli* EPEC e EHEC (Hueck, 1998; Galan & Collmer, 1999; Cheng & Schneewind, 2000; Schmidt & Hansel, 2004; Sani *et al.*, 2006). Segundo Tampakaki e colaboradores (2004) e Ando e colaboradores (2007), o TTSS é considerado um complexo sistema de transferência de proteínas, capaz de injetar diversos substratos protéicos através de ambas as membranas, bacteriana e da célula eucariótica hospedeira, diretamente para o interior do citosol. Os genes do TTSS são ativados sob determinadas condições, tais como o contato com a célula hospedeira. Uma vez injetados no interior da célula hospedeira, os fatores de virulência ou efetores irão co-optar as vias de sinalização da célula para promover respostas benéficas ao patógeno.

Nas diversas espécies de bactérias Gram negativas, os genes que compõem o TTSS codificam uma estrutura supramolecular semelhante a uma seringa, denominada Complexo Agulha (*Needle complex*) (revisado por Yip & Strynaka, 2006). Esse complexo permitirá que os efetores sintetizados no citoplasma dos patógenos atravessem as membranas interna e a externa e alcancem diretamente o citoplasma da célula hospedeira (O' Connel, 2004; Yip & Strynadka, 2006).

O TTSS é muito conservado em termos estruturais e funcionais nas diferentes espécies, enquanto os efetores secretados são bastante diversos (Galán & Colmer, 1999; Kubori *et al.*, 2000; Tamano *et al.*, 2000; Daniell *et al.*, 2001; Tampakaki *et al.*, 2004; Pallen *et al.*, 2005). De acordo com Aizawa (2001), estudos também apontam para a similaridade ou homologia apresentada entre as diversas proteínas que compõem o TTSS e o aparato flagelar de algumas bactérias indicando que estes dois sistemas podem ter evoluído paralelamente. O diagrama esquemático do TTSS de EPEC é ilustrado na Figura 3.

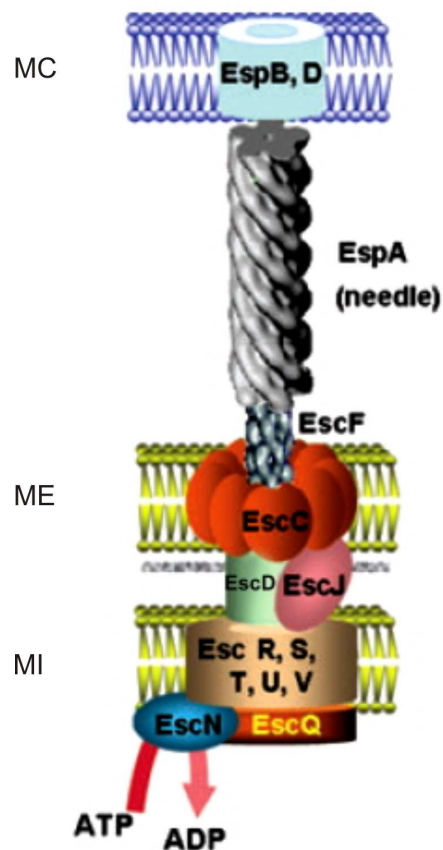


Figura 3. Representação esquemática do TTSS de *E. coli*. MC, membrana celular eucariótica. ME, membrana externa bacteriana. MI, membrana interna bacteriana (Adaptado de Tampakaki *et al.*, 2004)

As proteínas EscR, EscS, EscT e EscU, codificadas pelo operon LEE1 de EPEC, compõem o anel interno que se insere na membrana citoplasmática e conferem sustentação ao aparato. (Tampakaki *et al.*, 2004; Pallen *et al.*, 2005). As proteínas EscV, EscN e SepQ (EscQ) também estão presentes no anel interno, porém são codificadas pelo operon LEE3. EscV consiste em uma proteína inserida na membrana citoplasmática, que apresenta sete domínios transmembrânicos (Gauthier *et al.*, 2003). EscN corresponde uma proteína de aproximadamente 49 kDa, caracterizada como uma ATPase que fornece energia para a montagem do TTSS (Dahan *et al.*, 2004; Gálan e Wolf-Watz, 2006). SepQ é uma proteína situada na base do anel interno e ainda não teve a sua função plenamente esclarecida, mas estudos de homologia e de estrutura realizados por Pallen e colaboradores (2005), demonstraram que SepQ possui um domínio FliN similar ao observado na proteína YscQ de *Yersinia*, sugerindo que estas devem apresentar conformação semelhante.

As proteínas EscJ e EscD, codificadas por genes de LEE2 e LEE 4, respectivamente, projetam-se para o periplasma e conectam o anel interno ao anel externo, situado na membrana externa. EscJ também está associada à translocação de EscC para a membrana externa, enquanto EscD também interage com EscC (Creasey *et al.*, 2003a). A proteína EscC, codificada pelo operon LEE 2, compõe o anel externo do aparato e irá permitir a exportação de proteínas através da parede celular. O operon LEE 4, também contém os genes das proteínas EscF, que corresponde à agulha, um tubo oco através do qual as proteínas efetoras são deslocadas; EspA, que forma uma bainha ao redor de agulha e que não possui homólogos descritos em outros TTSS (Shaw *et al.*, 2001). As proteínas EspB e EspD interagem, formando um poro de translocação na membrana da célula hospedeira (Ide *et al.*, 2001). Tal estrutura ancora-se na ponta da agulha conectando a bactéria à célula hospedeira. O complexo agulha de *Salmonella typhimurium* e *Shigella*, bastante caracterizados, são apresentados na Figura 4.

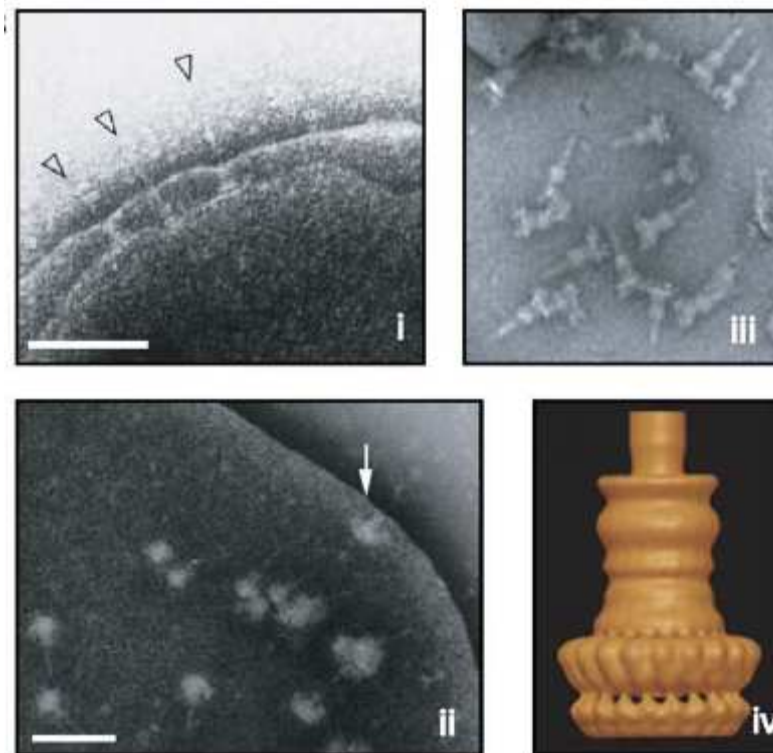


Figura 4. Representação do complexo agulha de *Salmonella typhimurium* e *Shigella* spp. (i) Microscopia eletrônica de transmissão exibindo o complexo agulha de *Salmonella* (setas). A barra de escala representa 100 nm. **(ii)** Microscopia eletrônica revelando o TTSS de *Shigella* disperso no envelope bacteriano. A barra de escala representa 100 nm. **(iii)** Micrografia eletrônica corada negativamente do TTSS de *Salmonella typhimurium* **(iv)** Representação da superfície do TTSS (adaptado de Pizarro-Cerdá & Cossart 2006).

Deng e colaboradores (2004), em um estudo bastante elaborado, produziram diversas linhagens mutantes para cada um dos 41 genes da PAI de *C. rodentium* e observaram que há uma hierarquia no mecanismo de regulação que controla a expressão dos genes TTSS. Além das proteínas estruturais, foram observados efetores, reguladores e também chaperonas, como CesAB, relacionada à secreção das proteínas EspA e EspB. (Wainwright & Kaper, 1998; Creasey *et al.*, 2003b). CesAB também é essencial para a estabilidade de EspA no citoplasma bacteriano. A complexa ativação e regulação do TTSS ainda não foi plenamente estabelecida, mas é sabido que uma série de fatores como o contato com a célula hospedeira, condição de pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e até “quorum sensing” influenciam o processo de indução, montagem

e ativação do TTSS (Tobe *et al.*, 1991; Kenny *et al.*, 1997; Sperandio *et al.*, 1999; Ando *et al.*, 2007).

O patotipo DAEC

Este patotipo, apesar de reconhecido como uma das seis classes de *E. coli* diarreiogênicas (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004), até o momento não possui um marcador genético específico, sendo por isso relatada de maneira controversa, inclusive muitas vezes equivocada, na literatura. Isto se deve ao fato dos parâmetros para a sua classificação basearem-se em características tais como o padrão de adesão difusa (Skaletsky *et al.*, 1984), anteriormente usado como critério único de classificação. Bilge e colaboradores (1996) caracterizaram uma fímbria presente na linhagem C1845 de DAEC, isolada de criança com diarreia. Esta fímbria foi definida como o fator de aderência responsável pelo fenótipo DA (adesão difusa), recebendo a denominação F1845. Por esta razão, a linhagem C1845 passou a ser considerada como protótipo de DAEC. A fímbria F1845 pertence à classe de adesinas denominadas Afa/Dr (Nowicki *et al.*, 2001). Outra adesina, denominada AIDA-I (Benz & Shimidt, 1989) também foi associada ao fenótipo de adesão difusa. Contudo, tais adesinas não foram unicamente relacionadas à virulência deste patotipo. O estudo de Campos (1999) verificou que a expressão de adesinas varia de acordo com as amostras analisadas. Taddei e colaboradores (2005), descreveram a presença do gene *sat* em DAEC, mas este também foi descrito para UPEC (*E. coli* uropatogênica) (Guyer *et al.*, 2001). Portanto, há uma dificuldade em estabelecer características específicas para este patotipo, sendo os estudos normalmente baseados na detecção de características tais como a presença de adesinas e o fenótipo de adesão difusa (Campos, 1999; Scaletsky *et al.*, 2002a; Lopes *et al.*, 2005).

Os resultados de diversos estudos epidemiológicos revelam que as DAEC e alguns patotipos de *E. coli* são detectados em escala mundial, sendo isolados tanto de pacientes com diarreia como de indivíduos sadios (Girón *et al.*, 1991b; Baqui *et al.*, 1992; 1993; Poitrineau *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1998; Rosa *et al.*, 1998; Okeke *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2005; Meraz *et al.*, 2006). Em alguns

estudos, os autores observaram taxas similares de isolamento de DAEC a partir de portadores assintomáticos e indivíduos diarréicos, não relacionando a doença à presença da DAEC. Entretanto, quando observaram a ocorrência da diarreia e DAEC em uma perspectiva idade-dependente, houve a correlação principalmente em crianças (Gunzburg *et al.*, 1993; Jallat *et al.*, 1993; Germani *et al.*, 1996; Scaletsky *et al.*, 2002b). De acordo com Spano e colaboradores (2008), em um estudo epidemiológico efetuado apenas com crianças, DAEC foi o patotipo mais prevalente, sendo isolado de 40 pacientes sintomáticos (18,3%) e de 7 (8,1%) indivíduos controle, de um total de 218 e 86, respectivamente.

Visando uma melhor descrição desse patotipo em relação aos demais, nosso grupo de pesquisa inclui uma terceira característica à definição de DAEC: a ausência de genes classicamente associados à virulência dos demais patotipos. Este último critério torna-se importante, pois permite a distinção entre as linhagens de DAEC e EPEC “atípicas”, as quais não albergam o plasmídeo EAF, tornando seu padrão de adesão difuso quando em culturas de células (Scaletsky *et al.*, 1999; Trabulsi *et al.*, 2002; Blanc-Potard *et al.*, 2002).

Assim, conforme discutido anteriormente, a análise do potencial patogênico de isolados de DAEC requer o emprego de uma estratégia alternativa, tal como a detecção de genes do TTSS, uma vez que estes são considerados indicadores de potencial patogênico para bactérias Gram negativas (Hueck, 1998; Stuber *et al.*, 2002). Uma vez que os genes do TTSS estão intimamente associados às ilhas de patogenicidade, acreditamos que sua detecção em DAEC, iniciada por Kyaw e colaboradores (2003), pode representar uma importante etapa na elucidação do potencial patogênico das diferentes linhagens deste patotipo. Neste sentido, este trabalho visa à caracterização de outros possíveis genes do TTSS em isolados de DAEC.

Objetivos

Uma vez que os genes do TTSS estão intimamente associados às ilhas de patogenicidade, este projeto tem como objetivos:

- A detecção, clonagem e caracterização de seqüências correspondentes a genes do TTSS, em isolados de DAEC.
- A análise da expressão dos prováveis genes do TTSS em isolados de DAEC.

Materiais e Métodos

1. Linhagens bacterianas

1.1. Linhagens de *Escherichia coli* de adesão difusa

As linhagens de DAEC utilizadas neste trabalho, C2, C12, C39, C40, C44 e C74, pertencem ao banco de amostras previamente caracterizadas pelo grupo da Prof. Dra. Loreny G. Giugliano, do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Brasília. Essas amostras, isoladas de crianças diarréicas, foram anteriormente caracterizadas fenotipicamente por meio de testes de adesão a células HeLa e quanto à presença de adesinas da família Afa/Dr. Foram também analisadas quanto à presença de genes classicamente associados aos demais patótipos de *Escherichia coli* por meio de experimentos de hibridização de colônias e/ou PCR. (Piva 1998).

Tais amostras foram testadas previamente quanto à presença dos genes *escC*, *escJ*, *escV* e *escN* do TTSS, por meio de hibridização de colônias e PCR (Kyaw, 2004).

1.2. Linhagens controle

A linhagem utilizada como controle positivo nos experimentos de PCR consistiu em uma *E. coli* enteropatogênica, denominada E2348/69, amplamente usada como o protótipo em estudos de TTSS. Como controle nos experimentos de extração de RNA, usamos também a amostra de EHEC EDL933, cujo genoma já foi totalmente sequenciado. Como controle negativo, empregamos a amostra *E. coli* C600 (K-12) uma linhagem padrão, não patogênica, gentilmente cedida pela Dra. Loreny G. Giugliano.

1.3. Linhagem transformante

- *E. coli* DH5- α (Invitrogen)

2. Plasmídeo

-**pGEM-T Easy** (Promega[®]) - Este plasmídeo é encontrado na forma linear, apresentando uma timina em cada extremidade 3', visando aumentar a eficiência de ligação dos produtos de PCR, por fornecer extremidades compatíveis com produtos de PCR que tiveram adeninas acrescentadas às extremidades 5' por determinadas *Taq* DNA Polimerases.

3. Meios de cultura

Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C/1 ATM/20 minutos.

3.1. Meio Luria-Bertani (LB)

Peptona de caseína	1,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)
pH final	7,2

3.2. Meio Luria-Bertani tamponado

Meio LB tamponado com Tris-HCl 0,1 M, pH final 7,5.

3.3. Meio LB ágar (LA)

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,5% (p/v), pH final 7,2.

4. Soluções, tampões e enzimas

4.1. Soluções de uso geral

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

Glicerol 70%

Glicerol 70%(v/v)

4.2. Soluções para eletroforese em gel de agarose

Tampão de Corrida Tris-Borato-EDTA - TEB (10X)

Trizma base 0,89 M

Ácido bórico 0,89 M

EDTA 0,02 M

pH final 8,0

Tampão de Corrida Tris-Acetato – TAE (50x) livre de RNase

Trizma base 2 M

Ácido acético glacial 57,1mL

EDTA 0,05 M

pH final 8,0

Tampão de Amostra (10 X)

Glicerol 50% (v/v)

Azul de bromofenol 0,1% (p/v)

Xileno cianol 0,1% (p/v)

Solução de Brometo de Etídio

Brometo de Etídio 10 mg/mL

4.3. Antibióticos e soluções utilizados na transformação e seleção de clones

Ampicilina

Solução estoque: 10 mg/mL em água destilada.

Esterilizada por filtração e armazenada ao abrigo da luz, a -20°C.

Concentração final de uso: 100 µg/mL.

IPTG

Solução estoque: 100 mM de IPTG em água.

Solução esterilizada por filtração e armazenada a -20°C.

X-GAL

Solução estoque: 2,5% de X-Gal em N,N-Dimetilformamida.

Armazenada a -20°C, ao abrigo da luz.

Cloreto de Cálcio

Cloreto de cálcio 100 mM

Solução esterilizada por filtração e armazenada a 4°C.

4.4. Enzimas

Taq DNA polimerase - 5U/μL (Invitrogen Life Technologies)

Taq DNA polimerase - 5U/μL (Cenbiot-RS)

DNAse I livre de RNase - 1U/μL (Invitrogen Life Technologies)

ImProm II transcriptase-reversa (Promega)

4.5. Marcadores de Massa Molecular (MM)

1kb DNA Ladder (Promega Corporation - N° de catálogo: G5711) – mistura equimolar de 13 fragmentos de 250/253, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000 e 10000 pares de base.

TTSS DNA Ladder (Laboratório de Microbiologia - Universidade de Brasília). Fragmentos de 287, 556, 826, 994, 1008, 1278, 1510, 1900 e 2151 pb, obtidos por meio de PCR utilizando o DNA de *E. coli* E2348/69 e iniciadores correspondentes aos genes do TTSS, e ainda DNA de *S. aureus*, utilizando o par de iniciadores dirigidos ao gene da proteína A.

High DNA Mass Ladder (Invitrogen Life Technologies N° de catálogo: 10496-016) – mistura equimolar de seis fragmentos de 10000, 6000, 4000, 3000, 2000 e 1000 bp. Quatro µL de High DNA Mass Ladder resultam em fragmentos contendo 200, 120, 80, 60, 40, e 20 ng de DNA, respectivamente.

4.6. Soluções para extração e precipitação de RNA

TRIzol[®] Reagent (Invitrogen)
Isopropanol livre de RNase
Etanol 100% livre de RNase
Etanol 75% livre de RNase
Clorofórmio
Acetato de sódio (estoque 3,0 M)
Água Milli Q livre de RNase

4.7. Solução estoque de dietilpirocarbonato (DEPC)

DEPC	0,1% (p/v)
------	------------

5. Kits utilizados

“Wizard[®] genomic DNA purification Kit”, Promega
“Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System”, Promega
“pGEM[®]- T Easy Vector System I”, Promega
“DNase I Amplification grade”, Invitrogen Life Technologies
“FlexiPrep Kit”, Amersham Pharmacia Biotech
“ImProm-II[™] Reverse Transcription System”, Promega

6. Cultivo e manutenção das linhagens bacterianas

6.1. Para extração de DNA:

A fim de padronizar os ensaios de PCR, 50 µl do estoque de células em glicerol foram inoculados em 5 mL de meio LB e incubados por cerca de 18 horas a 37°C. Procedeu-se a extração de DNA total com o Kit “Wizard genomic DNA purification Kit” (Promega) em quantidade suficiente para todos os ensaios deste trabalho.

Estoques foram mantidos em meio LB contendo 35% de glicerol, a -20°C.

6.2. Para extração de RNA:

As amostras de EHEC EDL933, EPEC E2348/69 e DAEC C39 e C74 foram inoculadas em meio LB e incubadas sob agitação a 37°C durante uma noite. Visando promover a ativação dos genes TTSS, 50 µL de cada cultura foram incubados em 5 mL de meio LB tamponado com Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, por diferentes períodos de tempo (0,5h, 1h, 2h, 3,5h e 5h). Em cada intervalo de tempo, alíquotas de 1,5 a 5 mL da cultura foram coletados por centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C e estocados a -20°C para a posterior extração de RNA total, empregando-se o reagente TRIzol[®]

7. Extração de DNA total para a realização de experimentos de PCR

(Adaptado do protocolo do kit “Wizard genomic DNA purification Kit”, Promega)

Resumidamente, o protocolo consiste em:

1. Centrifugar 1 mL da cultura crescida por uma noite a 13000 g por 2 minutos
2. Adicionar 600 µL de “nuclei lysis solution”. Pipetar gentilmente até a total ressuspensão das células.
3. Adicionar 3 µL de “RNAse solution” . Misturar e incubar a 37°C por 30 minutos, em seguida, resfriar a temperatura ambiente.
4. Adicionar 200 µL de “protein precipitation solution”. Agitar rapidamente.
5. Incubar no gelo por 5 minutos.

6. Centrifugar a 13000 g por 3 minutos.
7. Transferir o sobrenadante para um tubo novo e adicionar 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente. Misturar.
8. Centrifugar a 13000 g por 2 minutos e descartar o sobrenadante.
9. Adicionar 600 µL de etanol 70% gelado.
10. Centrifugar a 13000 g por 2 minutos.
11. Descartar o etanol e deixar o tubo secar por 15 minutos.
12. Ressuspender o precipitado de DNA em 100 µL de “rehydration solution” por uma noite, a 4°C.

8. Extração de DNA plasmidial

As extrações foram realizadas com o kit “FlexiPrep Kit” (Amersham Pharmacia Biotech Inc), com modificações.

Resumidamente, o protocolo consiste em:

1. Transferir 1,5 mL da cultura para um tubo tipo *ependorf* e submeter à centrifugação a 13000 rpm por 30 segundos.
2. Descartar o sobrenadante e repetir o procedimento.
3. Ressuspender o sedimento em 200 µL de solução I e homogeneizar vigorosamente.
4. Adicionar 200 µL de solução II e homogeneizar invertendo o tubo cuidadosamente algumas vezes.
5. Adicionar 200 µL de solução III e homogeneizar invertendo o tubo cuidadosamente várias vezes.
6. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos e transferir o sobrenadante para outro tubo.
7. Adicionar 2,5 V de etanol 100% gelado incubar a -20°C, por no mínimo 30 minutos.
8. Centrifugar a 13000 rpm por 30 minutos.
9. Descartar o sobrenadante e lavar o sedimento com 1 mL de etanol 70% gelado.

10. Centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos.
11. Descartar o sobrenadante, deixar o sedimento secar e ressuspendê-lo em água Milli-Q.

9. Extração de RNA total

As células cultivadas conforme descrito no item 6.2, foram submetidas à extração de RNA de acordo com o manual do fabricante do TRIzol[®] Reagent (Invitrogen).

A tubos de 2 mL contendo as células, foram adicionados de 1 a 1,5 mL de TRIzol, sendo as células lisadas por meio de repetidas pipetagens. Os homogeneizados foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente, quando adicionou-se de 200 a 300 µL de clorofórmio, dependendo do volume inicial de TRIzol. Após agitação por 15 segundos, os tubos foram centrifugados a 12000 g por 15 minutos, a 4°C, a fim de separar as fases. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para outro tubo novo e adicionou-se de 500 a 700 µl de isopropanol para a precipitação do RNA. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento (RNA) lavado com etanol 75%. O tubo foi então centrifugado a 7500 g por 5 minutos a 4°C, o etanol descartado e o sedimento seco por 10 minutos à temperatura ambiente. Os sedimentos foram ressuspensos em volumes que variaram de 30 a 60 µL de água Milli Q livre de RNase.

9.1. Análise dos RNAs totais

Todo o material empregado para preparação do gel, bem como os utensílios plásticos, espátulas, vidraria e cubas de eletroforese foram previamente submetidos a 180°C por uma noite, ou tratados com solução DEPC, para inativação de RNases.

O gel de agarose na concentração de 0,8% foi elaborado em tampão TAE 1X e brometo de etídio na concentração final de 0,5µg/mL. Às amostras foi

adicionado tampão de amostra para a concentração de 1X. Após aplicação das mesmas, o gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida TAE 1X e após a corrida, o RNA foi visualizado por meio de transluminador ultravioleta.

10. Tratamento do RNA total com DNase I livre de RNase

Após a verificação da integridade e quantificação (com auxílio do High Mass Ladder) dos RNAs em gel de agarose 0,8%, em condições livre de RNase (Sambrook & Russel, 2001), o RNA total foi submetido ao tratamento com DNase I livre de RNase (Invitrogen) a fim de eliminar qualquer presença de DNA contaminante.

Conforme o protocolo do fabricante, 1µl de enzima (1U) foi adicionado para 1 µg de RNA. Os sistemas foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, a DNase I foi inativada pela adição de EDTA 2,5 mM, sendo os tubos incubados a 65°C por 10 minutos.

Os RNAs foram novamente precipitados com etanol e o sedimento ressuspensado no mesmo volume inicial. A eficiência do procedimento foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose, em condições livres de RNase.

11. Condições empregadas nos experimentos de PCR para a amplificação de genes do TTSS.

Ao longo deste trabalho os ensaios de PCR foram realizados empregando iniciadores específicos para os diferentes genes do TTSS (Tabela 1), sob várias condições. Assim, descrevemos apenas as condições gerais empregadas.

Tabela 1. Seqüências dos iniciadores empregados nos ensaios de PCR.

Iniciador	Seqüência dos oligonucleotídeos	Tm em 50 mM Na ⁺	Tamanho esperado
rorf1-for	5' cga gga tat cag gtt c 3'	45,2°C	781 pb
rorf1-rev	5' aat tgc att ttt cat tgc 3'	44,6°C	
Orf2-for	5' cga taa ctg agc tgg aag acg 3'	55,2°C	495 pb
cesAB-rev	5' tgg ctt tta gat ctt gct gga 3'	54,1°C	
RST3-for	5' ctt agc att att cag gaa tga tga 3'	52,4°C	714 pb
escR-rev	5' gca cac ata att gaa caa aat atc 3'	49,2°C	
escT-for	5' ttt gaa atg att ccg aag g 3'	47,9°C	837 pb
RST4-rev	5' gtt ttt tgg gtg tgg cg 3'	52,6°C	
sepQ-for	5' att acg tcc gaa ggt cat gc 3'	55,0°C	740 pb
sepQ-rev	5' gca ccc acc aaa aag atg at 3'	53,6°C	
*N1-for	5' cgc ctt tta caa gat aga ac 3'	62,0 °C	856 pb
*N2-rev	5' cat caa gaa tag agc gga c 3'	58,0°C	
**gap for	5' gtt cac gct act acc gct ac 3'	55,0°C	253 pb
**gap rev	5' gct ttg atc tgc tcg taa gt 3'	55,0°C	

* Iniciadores empregados nas PCR controles visando testar a eficiência das condições de RT-PCR e também para checar a ausência de contaminação das amostras de RNA por DNA genômico.

** Iniciadores específicos para o gene constitutivo da enzima da via glicolítica, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase empregados como controle interno de amplificação.

Os experimentos de PCR foram realizados em um termociclador PTC-100 (MJ Research) e no termociclador PCR Express (Thermo Hybaid) no caso de PCR empregando gradiente de temperatura, utilizando-se sistemas com volume final de 30 µL contendo:

DNA	50 ng
Tampão de reação	1X
MgCl ₂	1,5 mM
Iniciador 1	0,3 µM
Iniciador 2	0,3 µM
dNTPs	0,2 mM
Taq DNA polimerase	2U/sistema

As condições empregadas nos ensaios de PCR tiveram as temperaturas de anelamento variando entre 46 a 62,2°C, dependendo dos diferentes pares de iniciadores e da origem do DNA empregado como molde. De maneira geral as condições foram:

1. Desnaturação a 95°C por 2 minutos.
2. Desnaturação a 95°C por 1 minuto.
3. Anelamento 46-62,2°C por 1 minuto.
4. Extensão a 72°C por 2 minutos.
5. Repetição das etapas 2 a 4 por 35 vezes
6. Extensão a 72°C por 5 minutos.
7. Manutenção da temperatura a 4°C

Cerca de ¼ da reação de amplificação dos diferentes ensaios de PCR usando como molde o DNA proveniente das amostras de DAEC com os iniciadores específicos do TTSS, da PCR empregando como molde o cDNA proveniente das reações de RT-PCR e do DNA plasmidial resultante da extração das células transformadas, foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose na concentração de 0,8-1% confeccionado em tampão TEB 1X, contendo brometo de etídio na concentração final de 0,4µg/mL. Às amostras foi adicionado tampão de amostra para a concentração final de 1X. Após aplicação das mesmas, o gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida TEB 1X, sendo o DNA visualizado em transluminador ultravioleta.

12. Condições empregadas nos experimentos de RT- PCR para análise da expressão de genes do TTSS.

12.1. Síntese da fita de cDNA

A reação de síntese da fita de cDNA foi realizada empregando-se 1µg de RNA total das amostras descritas e cultivadas conforme o item 6.2, tratado com DNase I livre de RNA (como descrito no item 10), usando o Kit “ImProm-II™

Reverse Transcription System” (Promega). De acordo com as instruções do fabricante, ao RNA foi adicionado 1µL de “random primer”, sendo a mistura incubada a 70°C por 5 minutos, e em seguida incubada em gelo por 5 minutos. Em seguida, para um volume final de 20µL, os seguintes reagentes foram adicionados (nas concentrações finais indicadas): tampão da transcriptase reversa 5X; MgCl₂ 6 mM; dNTP MIX contendo 0,5 mM de cada nucleotídeo; inibidor de ribonuclease 20U; enzima ImProm-II Reverse Transcriptase 1U e água livre de nuclease para completar o volume final. Os tubos foram colocados em um bloco aquecido a 25°C por 5 minutos. Em seguida, foram incubados a 42°C por 1 hora. Por fim, a enzima foi inativada por incubação a 70°C por 15 minutos.

Para todos os sistemas foi realizado um controle da RT-PCR omitindo-se a enzima transcriptase reversa, para a verificação de possível contaminação por DNA genômico. Como controle foi também adicionado um sistema no qual o RNA extraído foi omitido.

12.2. Reação de amplificação dos cDNAs do TTSS

Uma alíquota correspondente a aproximadamente 1/5 (4,5µL) da reação de síntese de cDNA foi submetida à reação de amplificação em um volume final de 30 µL contendo: tampão de reação 1X; 2,0 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs; 0,3 mM de cada iniciador específico e 2U da enzima *Taq* DNA Polimerase. As etapas de amplificação foram as mesmas descritas no item 11, com a temperatura de anelamento variando de acordo com as seqüências iniciadoras utilizadas na reação. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio na concentração final de 0,4µg/mL. Como controle da indução da expressão dos RNAs utilizamos o par de iniciadores GAP F e GAP R, direcionados ao gene que codifica a enzima da via glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, de expressão constitutiva e ainda o par de iniciadores N1 e N2. (Tabela 1).

13. Clonagem dos produtos amplificados pelos pares de iniciadores específicos no vetor p GEM-T

Os fragmentos de DNA gerados pelas PCRs empregando os diversos iniciadores foram purificados utilizando o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega) e então clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Cerca de 5µL dos sistemas de ligação foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* DH5-α.

14. Transformação de *E. coli* por choque térmico

Pré-inóculo:

Cerca de 50 µL de uma cultura de células DH5-α foram inoculados em 5 mL de meio LB e incubados em agitador a 37°C, por uma noite.

Transformação:

- 1- Do pré-inóculo crescido por aproximadamente 12 horas, foram retirados 300 µL e transferidos para 30 mL de LB e incubados sob agitação, a 37°C, até a cultura atingir 0,2 a 0,3 de Abs₆₆₀ ηm (2×10^7 células/mL).
- 2- As células foram centrifugadas a 4000 g, por 10 minutos, a 4°C.
- 3- O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 1,5 mL de solução gelada de CaCl₂ 100 mM.
- 4- As células ressuspensas foram incubadas em gelo por 20 minutos
- 5- Em seguida, estas foram centrifugadas a 2000 g, por 10 minutos, a 4°C.
- 6- O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 1,0 mL de solução gelada de CaCl₂ 100 mM.
- 7- Em uma alíquota de 100 µL das células tratadas, foram adicionados 5 µL do sistema de ligação, sendo o sistema incubado a 0°C por 30 minutos.

Choque térmico:

- 8- Em seguida, os tubos foram imersos em banho a 37°C por 5 minutos.
- 9- Após este período 1,0 mL de LB foi adicionado a cada tubo, sendo estes incubados a 37°C, por 1 hora.

Semeadura:

Para cada inserto clonado foram utilizadas 4 placas de meio LA previamente preparadas, contendo X-GAL, IPTG e ampicilina. Estas foram semeadas com volumes de 100 µL em duas placas e 200 µL nas outras duas, por espalhamento com o auxílio de pérolas de vidro, até completa absorção pelo meio. Por fim, as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante a noite.

Seleção dos clones transformantes:

Foram considerados clones transformantes aqueles que cresceram no meio contendo ampicilina e que apresentavam coloração branca, resultante da inativação do gene de β-galactosidase.

15. Seqüenciamento automático dos fragmentos de DNA produtos de PCR e dos plasmídeos recombinantes contendo como inserto os produtos das PCRs e análise das seqüências de nucleotídeos geradas.

As reações de seqüenciamento automático foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular utilizando o seqüenciador MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences), empregando-se cerca de 150ng do DNA proveniente dos ensaios de PCR ou cerca de 200 ng dos plasmídeos e ainda 5 picomoles de cada iniciador. O kit utilizado foi “DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing”.

As duas fitas de cada fragmento de DNA obtido foram seqüenciadas a fim de se obter a melhor qualidade do amplicom. As seqüências nucleotídicas geradas pelo seqüenciador automático foram processadas no site <http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html> pelo programa PHRED (*phred* >20) e CAP3, para a leitura das bases, montagem, análise e visualização dos *contigs* individuais (Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998).

As análises de similaridade das seqüências obtidas, foram realizadas com o auxílio dos programas BLAST (Altschul *et al.*, 1997) e FASTA (Pearson, 1990), disponíveis nos sites <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> e <http://www.ebi.ac.uk/fasta33>, respectivamente. Os alinhamentos múltiplos foram realizados utilizando-se a

ferramenta de alinhamento ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), incluída no programa MacVector (Oxford Molecular Group).

Resultados e Discussão

1. Definição dos genes TTSS e escolha das amostras de DAEC

Uma vez que os prováveis genes *escC*, *escJ*, *escN* e *escV* foram anteriormente detectados em amostras de DAEC (Kyaw *et al.*, 2003; Kyaw, 2004), buscamos determinar quais outros genes TTSS essas linhagens albergariam.

Para tanto, nosso grupo definiu um conjunto de novas seqüências iniciadoras, com base na ilha de patogenicidade LEE de *E. coli* E2348/69. Neste sentido, foram escolhidas as seqüência relativas à *rorf1*, *cesAB*, *escR*, *escT* e *sepQ* conforme ilustrado nas figuras 5 e 6.

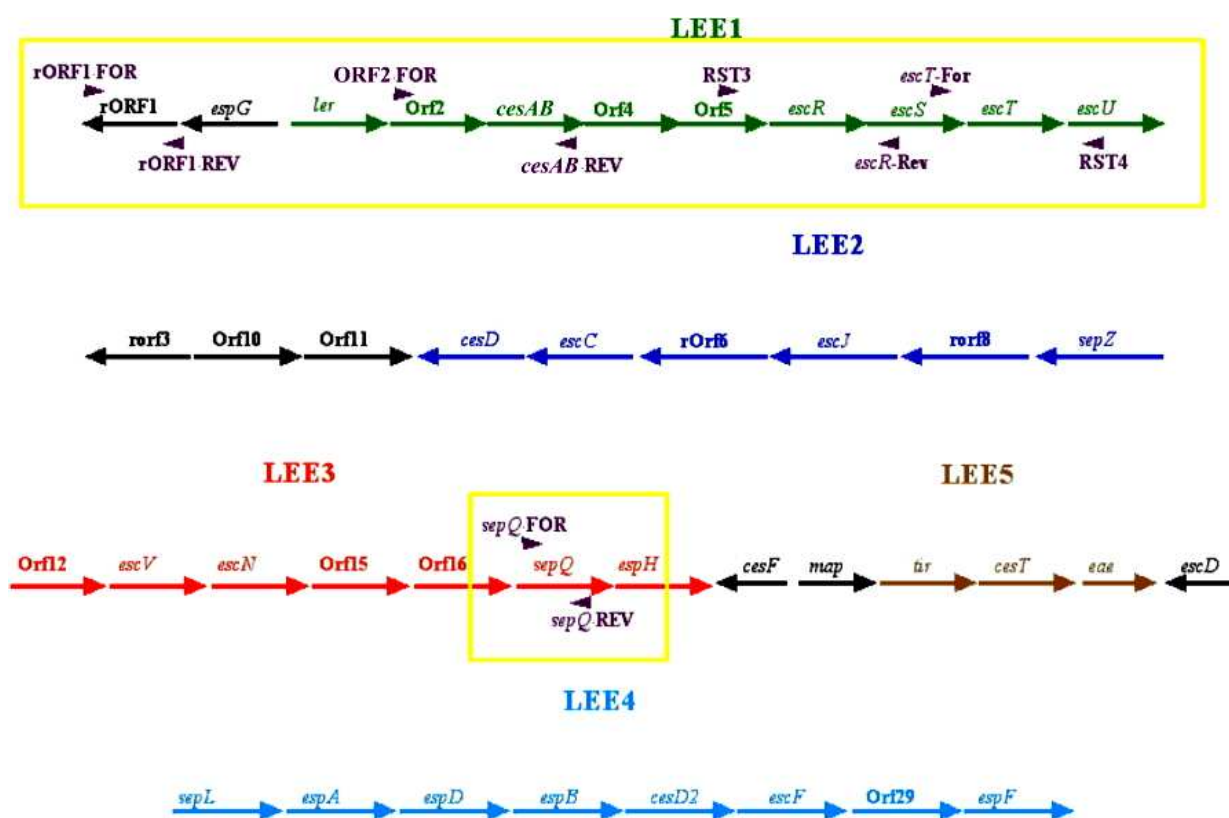


Figura 5. Esquema da ilha LEE de *E. coli* 2348/69, ilustrando os genes para os quais novos iniciadores foram sintetizados (retângulos amarelos). Em roxo são apresentados os iniciadores utilizados.

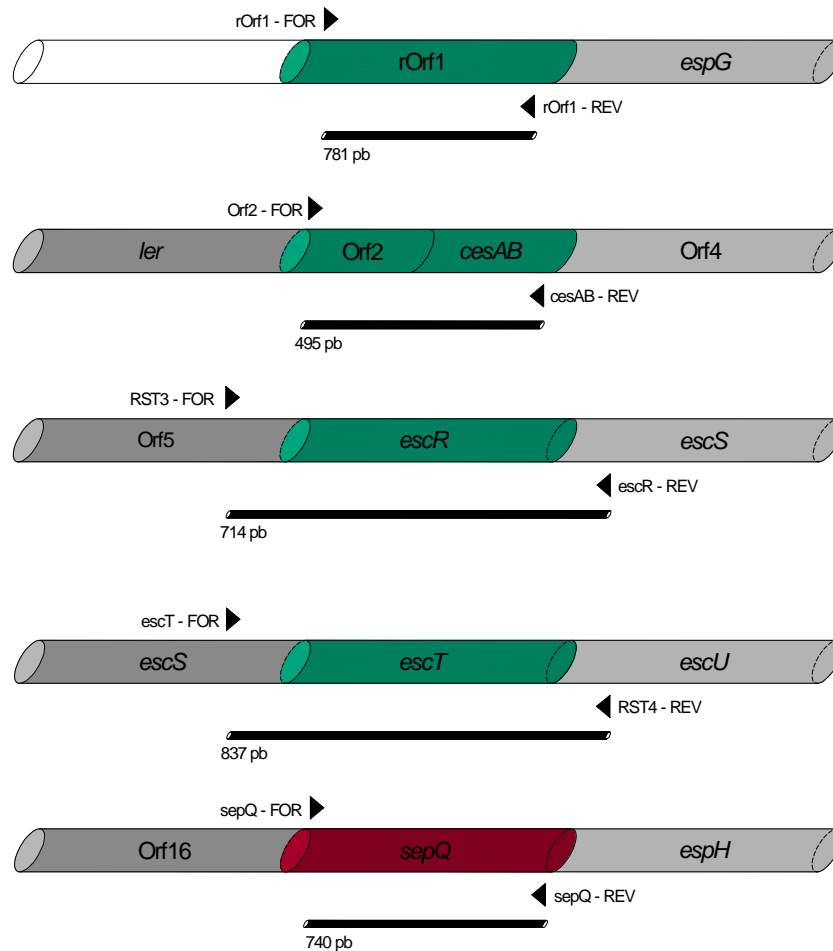


Figura 6. Esquema das seqüências relativas à *rorf1*, *orf2/cesAB*, *escR*, *escT* e *sepQ*, com suas regiões flanqueadoras, conforme encontrados na ilha LEE de EPEC E2348/69. As setas correspondem às seqüências iniciadoras utilizadas neste trabalho e a barra escura, o tamanho do fragmento esperado na amplificação.

Dentre as amostras de DAEC disponíveis em nosso laboratório, selecionamos as amostras isoladas de crianças diarréicas denominadas C2, C12, C39, C40, C44 e C74, previamente caracterizadas fenotípica e genotipicamente (Piva, 1998), conforme ilustrado na tabela 2. Também utilizamos nos ensaios o controle positivo E2348/69 de EPEC e o controle negativo C600 (K12).

Tabela 2. Características das amostras de DAEC selecionadas.

Amostra	Isolado	Sorotipo	Adesão	AFA/Dr¹	eae²	EAF³	bfp⁴
C2	12.5	O6:H5	loc/difusa	+/-	-	-	-
C12	20.4	O11:H ⁻	difusa	+	-	-	-
C39	69.5	O11:H ⁻	difusa	+	-	-	-
C40	75.1	O2:H4	difusa	+	-	-	-
C44	93.5	O2:H4	difusa	+	-	-	-
C74	190.5	O11:H ⁻	difusa	+	-	-	-

¹Família de adesinas classicamente associadas ao padrão de adesão difuso. ²Gene responsável pela lesão A/E. ³Plasmídeo (EPEC Adherence factor) relacionado a padrão de adesão de EPEC. ⁴Operon (bundle forming pilus) que codifica uma fímbria classicamente associada a EPEC.

Embora inicialmente selecionadas, ao longo do trabalho algumas amostras não apresentaram reprodutibilidade satisfatória durante os ensaios de PCR. Por essa razão selecionamos apenas as amostras C39 e C74 para continuarmos os ensaios de PCR, clonagem e seqüenciamento.

2. Padronização das condições empregadas na PCR

A partir do estoque de DNA total previamente extraído e quantificado, definimos os parâmetros e concentração dos reagentes a serem utilizados nos experimentos de PCR, conforme descrito por Sambrook & Russel (2001). Calculamos também as melhores temperaturas de anelamento para nossos iniciadores levando em conta o conteúdo de A+T e G+C, conforme a equação proposta por Thein & Wallace (1986), onde Tm (em °C) = 2(A+T) + 4(G+C).

Estratégias distintas foram utilizadas nas amplificações utilizando o DNA da amostra C39 e da amostra C74 conforme será detalhado nas seções seguintes.

3. Isolamento e caracterização de prováveis genes TTSS

3.1. Detecção e caracterização da provável rorf1 de DAEC

Pouco se sabe sobre o papel da rorf1 em relação a sua função ou contribuição para virulência. Aparentemente, esta seqüência codifica uma proteína de membrana externa em EPEC. Análises de seqüência indicam que o

produto da *rorf1* é similar a uma proteína predita, relacionada à virulência em *Salmonella typhimurium* (Cirillo *et al.*, 1996; Elliot *et al.*, 1998). A seqüência *rorf1* é também encontrada na ilha de patogenicidade de EHEC e de *Citrobacter rodentium* (Deng *et al.*, 2001). Embora conservada evolutivamente, tal seqüência encontra-se em locais distintos nos diferentes organismos, estando situada anteriormente ao LEE1 em EPEC e EHEC, enquanto em *C. rodentium* localiza-se após o operon LEE4 (Deng *et al.*, 2001).

3.1.1. Experimentos de PCR

A amplificação do provável gene referente à *rorf1* tornou-se possível ao se estabelecer uma temperatura de 50°C para anelamento dos iniciadores, quando utilizado o DNA da amostra C39, conforme ilustrado na figura 7B. Já para a amostra C74 a dificuldade de estabelecimento da temperatura ideal nos levou ao uso da PCR empregando um gradiente de temperatura, o qual variou de 47°C a 62°C. Os produtos de amplificação empregando os DNAs das duas amostras foram posteriormente reunidos, purificados e utilizados nas reações de seqüenciamento e clonagem.

É possível notar nas Figuras 7b e 7C a diferença na qualidade da amplificação do DNA das amostras C39 e C74 em relação ao controle positivo, mesmo sendo utilizada a mesma concentração de DNA. Tal diferença torna-se ainda mais evidente em relação ao resultado obtido com o DNA da amostra controle, EPEC E2348/69.

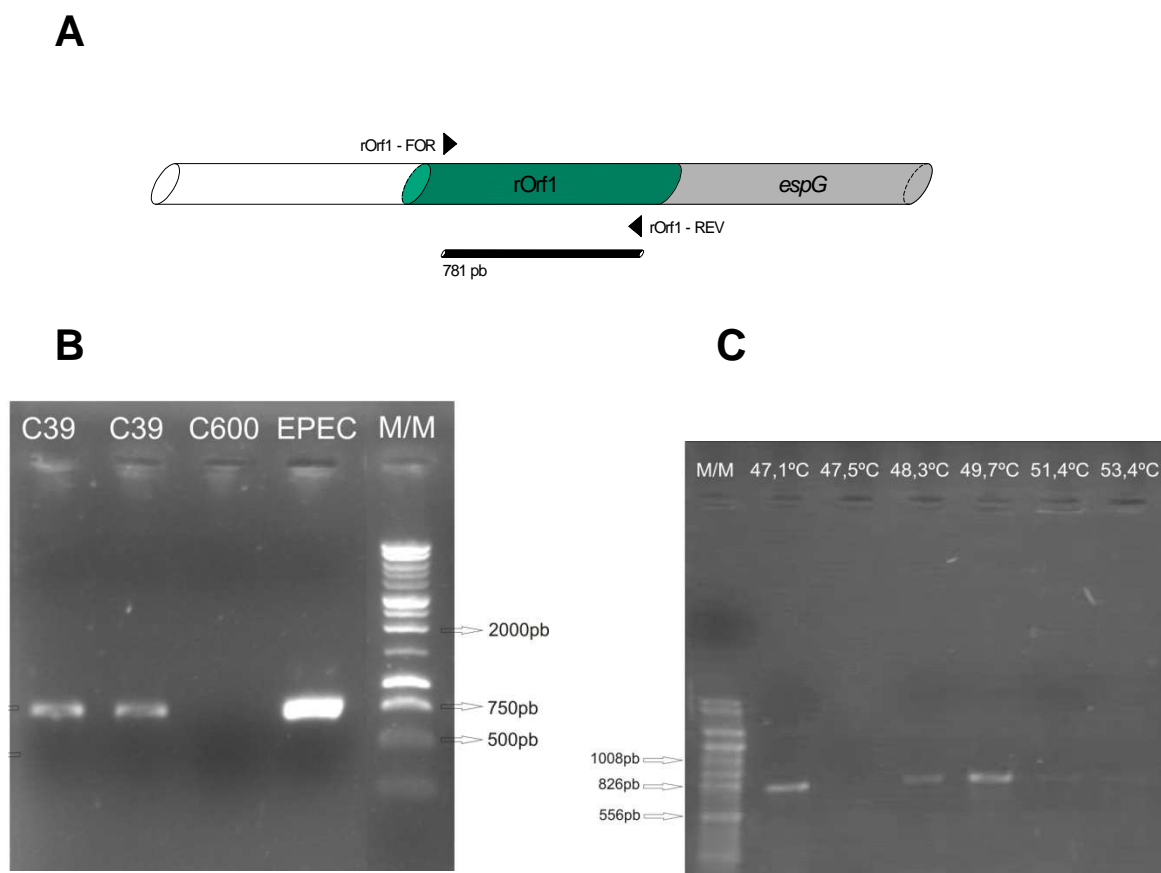


Figura 7 - (A) Diagrama esquemático da rorf1 e suas regiões flanqueadoras em EPEC E2348/69. São assinalados os iniciadores utilizados neste trabalho (triângulos) e o tamanho do fragmento esperado na amplificação (barra inferior). **(B)** Perfil eletroforético dos produtos amplificados no experimento de PCR empregando-se os iniciadores rorf1 for/rorf1 rev, com o DNA de C39 e dos controles negativo C600(K12) e positivo EPEC E2349/68. MM: Marcador de massa molecular 1kb Ladder (Promega). **(C)** Perfil eletroforético dos produtos de PCR em gradiente de temperatura, empregando os iniciadores rOrf1 for/rOrf1 rev, e o DNA de C74. MM: Marcador de massa molecular TTSS Ladder.

3.1.2. Sequenciamento dos produtos de PCR

O produto amplificado a partir do DNA da amostra C39 foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega) e o plasmídeo transformado em *E. coli* DH5 α . Clones brancos, provavelmente contendo o inserto, foram cultivados em meio contendo ampicilina e posteriormente submetidos à extração de DNA plasmidial e PCR com os iniciadores Universal e Reverso, a fim de verificarmos a presença do inserto de interesse (Figura 8). Foram selecionadas seis colônias supostamente contendo o

inserto, porém, ao observarmos o perfil eletroforético do DNA plasmidial, quatro clones foram positivos quanto à presença do inserto. A diferença no perfil do DNA plasmidial pode ser notada tanto no gel da extração plasmidial como no gel da PCR utilizando como molde este DNA plasmidial.

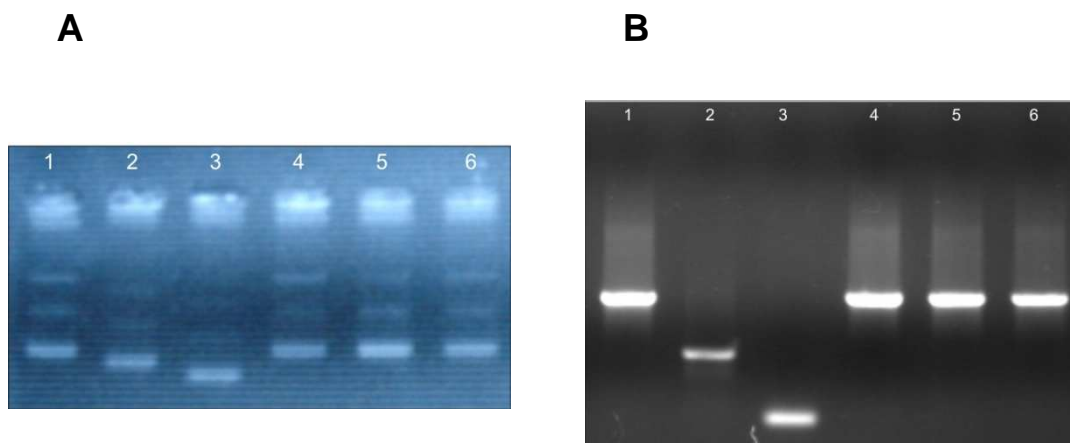


Figura 8. (A) Perfil eletroforético do DNA plasmidial purificado a partir dos clones transformantes contendo o fragmento de DNA correspondente da amostra C39 e (B) da PCR empregando o DNA plasmidial e os iniciadores Universal e Reverso.

Os fragmentos de DNA obtidos nos experimentos de PCR e aqueles clonados foram submetidos ao seqüenciamento. Para o seqüenciamento dos produtos de PCR foram utilizados os iniciadores específicos rorf1 for/ rorf1 rev e para o DNA plasmídial foram utilizados os iniciadores Universal e Reverso, possibilitando assim o seqüenciamento completo de todo o inserto.

A seqüência rorf1 de EPEC possui 1170 pb. Nossos iniciadores foram desenhados a partir das regiões mais conservadas dos genes em relação a *E. coli* E2348/69, de modo a parearem-se com provável gene, de maneira que parte de sua seqüência não foi amplificada. Assim, a PCR geraria um produto de 781 pb (Figura 7A). O tamanho dos fragmentos de DNA obtidos a partir do DNA genômico das amostras C39 e C74 observados em gel de agarose mostrava-se condizente com o esperado (Figura 7B e 7C) e, a partir do seqüenciamento, foi possível confirmar a existência da seqüência correspondente à rorf1.

Análises de similaridade foram realizadas em relação aos genes e às proteínas preditas disponíveis em bancos de dados utilizando os programas

BLAST e FASTA. Quando possível, realizamos as análises empregando os *contigs* gerados com auxílio do programa PHRED, após o seqüenciamento de vários produtos amplificados. Caso contrário, as seqüências geradas foram analisadas individualmente. Apesar de exaustivas repetições nos ensaios de PCR, não foi possível obter material suficiente para clonagem do DNA da amostra C74 sendo os resultados do seqüenciamento referentes apenas ao DNA obtido nas reações de PCR.

Conforme apresentado na Tabela 3, os fragmentos de DNA analisados revelaram um maior grau de similaridade com a *rorf1* de linhagens de *E. coli* isoladas de animais, como coelhos e bezerros, que com isolados de EPEC de origem humana. Os valores de similaridade observados para os fragmentos gerados a partir do DNA da amostra C74, apesar de elevados, foram inferiores àqueles observados para a amostra C39, talvez devido à menor qualidade das seqüências geradas, quando analisadas pelo programa PHRED. Os maiores graus de similaridade encontrados para a amostra C39, foram com linhagens de *E. coli* isoladas de animais, mas é interessante observar que os valores obtidos em relação a linhagens patogênicas para humanos também foi bastante elevado. Nota-se que a linhagem B171-8 do sorotipo O111:H⁻, também considerada uma linhagem protótipo de EPEC (Ogura *et al.*, 2008), apresentou maior grau de similaridade que EPEC E2348/69, a linhagem utilizada como molde para a síntese das seqüências iniciadoras. Em relação à amostra C74, os valores de similaridade encontrados foram menores, sendo, no entanto, bastante elevados em relação às linhagens de EPEC, EHEC. As análises de similaridade foram focadas nos maiores escores e também em linhagens patogênicas de humanos associadas a surtos, além da espécie *Citrobater rodentium* que possui uma ilha de patogenicidade muito similar (Deng *et al.*, 2004). Os resultados obtidos sugerem a presença de um TTSS conservado em nossas amostras de DAEC.

Tabela 3 – Análise de similaridade dos fragmentos de DNA gerados pelo par de iniciadores rorf1 for/ rorf1 rev.

gene/amostra	acesso	organismo	origem	identidade
rOrf1/C39 (699pb)	AF453442	REPEC O103:H2	coelhos	100% em 699nt
	AJ277443	STEC O26:H ⁻	bovinos	99% em 699nt
	AB426060	EPEC O111:H ⁻	humanos	99% em 695nt
	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humanos	93% em 693nt
	AF022236	EPEC E2348/69 O127:H7	humanos	92% em 693nt
	AF311901	<i>Citrobacter rodentium</i>	murinos	87% em 695nt
rOrf1/C74 (757pb)	AB426060	EPEC O111:H ⁻	humanos	85% em 763nt
	AJ277443	STEC O26:H ⁻	bovinos	85% em 763nt
	AF453441	REPEC O15:H ⁻	coelhos	85% em 763nt
	AF200363	REPEC O15:H ⁻	coelhos	85% em 763nt
	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humanos	80% em 732nt
	AF022236	EPEC E2348/69 O127:H7	humanos	80% em 732nt

Devido às diferenças nos valores de similaridade observados em relação às amostras C39 e C74, realizamos alinhamentos múltiplos entre nossas amostras e as de maior escore, além de EPEC E2348/69, com o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Foi interessante notar que EPEC E2348/69 possui cerca de 46 nucleotídeos distintos em relação à amostra C39 e as amostras de REPEC O103:H2 e EPEC O111:H⁻. Também foi possível observar que a amostra C74 apresentava uma maior diferença em relação às demais. Tal fato poderia indicar uma possível origem clonal distinta em relação às seqüências analisadas, no entanto, em virtude da baixa qualidade obtida no seqüenciamento (*phred* ≤ 20), este deverá ser repetido, a fim de confirmarmos tal observação.

3.2. Detecção e caracterização da possível orf2 e do provável gene *cesAB*

A *orf2* e o gene *cesAB* encontram-se no operon LEE 1 de EPEC E23468/69. Esse operon contém, além de genes que codificam proteínas estruturais do TTSS, o gene *cesAB*, que codifica uma chaperona das proteínas secretadas EspA e EspB. Sua função foi elucidada por Creasey e colaboradores (2003b), que demonstraram interações específicas entre CesAB-EspB e CesAB-EspA, revelando que CesAB é essencial para a estabilidade de EspA no citoplasma bacteriano. Estes autores também demonstraram que CesAB é requerida para a secreção de EspA e EspB, uma vez que mutantes de *cesAB* não secretavam essas proteínas. As proteínas EspA e EspB já foram identificadas como fatores de virulência e reconhecidas em infecções em humanos (Abe, *et al.*, 1998; Tacket *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000). Por outro lado, o papel da *orf2* ainda não foi totalmente determinado, entretanto Pallen e colaboradores, em 2005, realizaram um estudo empregando análises de bioinformática, as quais revelaram homologia entre a *orf2* de *E. coli* e o gene *yscE* de *Yersinia* spp., sugerindo inclusive a renomeação da *orf2* para *escE*.

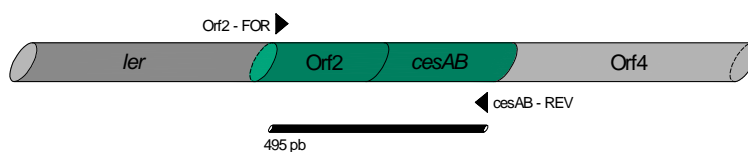
3.2.1. Experimentos de PCR

Utilizando o par de iniciadores *orf2/cesAB rev* (figura 10A), ensaios de PCR foram realizados com as amostras C39 e C74. Esse par de iniciadores foi desenhado de maneira a parear-se internamente na *orf2* e no gene *cesAB* de EPEC (figura 10). Ao estabelecer-se uma temperatura de anelamento de 50°C foi possível gerar o produto de tamanho esperado a partir do DNA da amostra C39 e também para o controle positivo (figura 10B).

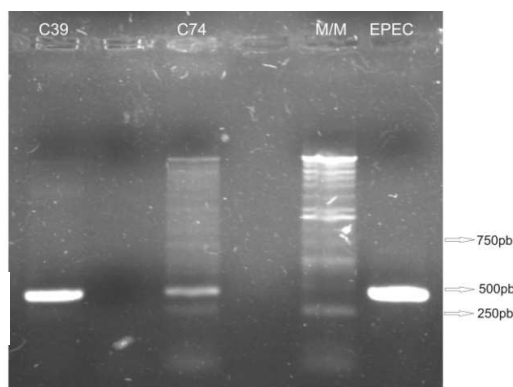
Em relação à amostra C74, esta temperatura mostrou-se pouco adequada, uma vez que gerava produtos inespecíficos e uma menor quantidade de DNA amplificado em relação à amostra C39 e ao controle positivo. Para solucionar este problema realizamos a PCR em gradiente de temperatura e foi curioso notar que o experimento resultou na amplificação de fragmentos de DNA em uma faixa de temperatura mais baixa, em torno de 47°C, mas também outros apresentando

fragmentos de DNA provavelmente inespecíficos e melhor amplificação em temperaturas mais altas, 59,6, 61,7 e 62,2°C (figura 10C). Contudo, ao tentarmos novas amplificações na temperatura de 62°C não obtivemos qualquer amplificação. Assim, mantivemos a estratégia de recuperar os fragmentos de tamanho esperado a partir do gel de agarose. Todo o DNA recuperado foi purificado e quantificado, sendo então utilizado nos procedimentos subsequentes.

A



B



C

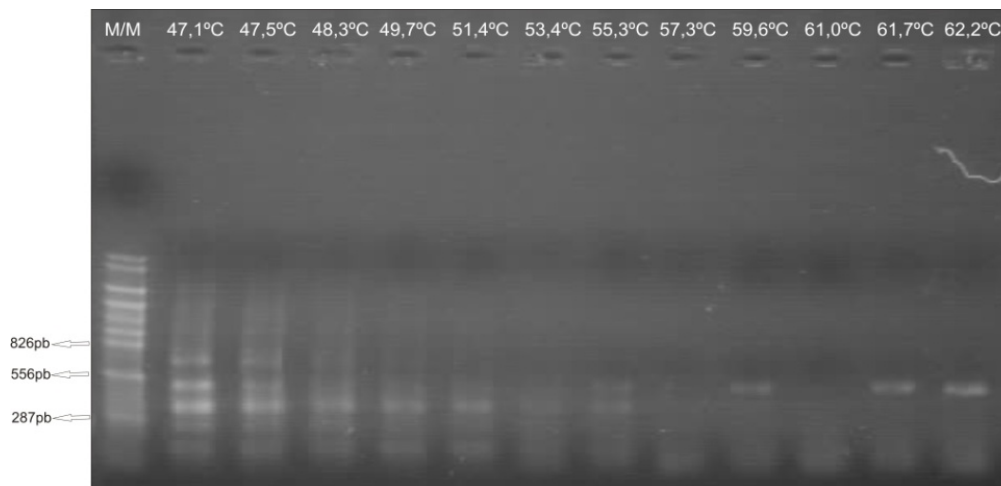


Figura 10. (A) Diagrama da *orf2/cesAB* com suas regiões flanqueadoras em EPEC E2348/69. São assinaladas, as seqüências iniciadoras utilizadas neste trabalho e o tamanho do fragmento esperado na amplificação. **(B)** Perfil eletroforético dos produtos de PCR, empregando os iniciadores *orf2 for/ cesAB rev*, com DNA de C39 e dos controles negativo C600(K12) e positivo E2349/68. MM: Marcador de massa molecular 1kb DNA Ladder (Promega). **(C)** Perfil eletroforético dos produtos de PCR em gradiente de temperatura, empregando os iniciadores *orf2 for/ cesAB rev*, com DNA de C74. MM: Marcador de massa molecular TTSS Ladder.

3.2.2. Seqüenciamento e caracterização dos produtos de PCR.

Os fragmentos de DNA do isolado C39 foram submetidos à clonagem no vetor pGEM-T Easy (Promega) e células competentes da linhagem DH5- α foram transformadas. As células que continham o inserto foram selecionadas e submetidas à extração de DNA plasmidial e PCR com os iniciadores Universal e Reverso para confirmação da presença do inserto (Figura 11). Um total de quatro clones transformantes foram selecionados e analisados quanto à presença do inserto. Para a amostra C74, os fragmentos de DNA provenientes da PCR foram purificados, quantificados e submetidos diretamente ao seqüenciamento com os iniciadores específicos orf2-for/ cesAB-rev.

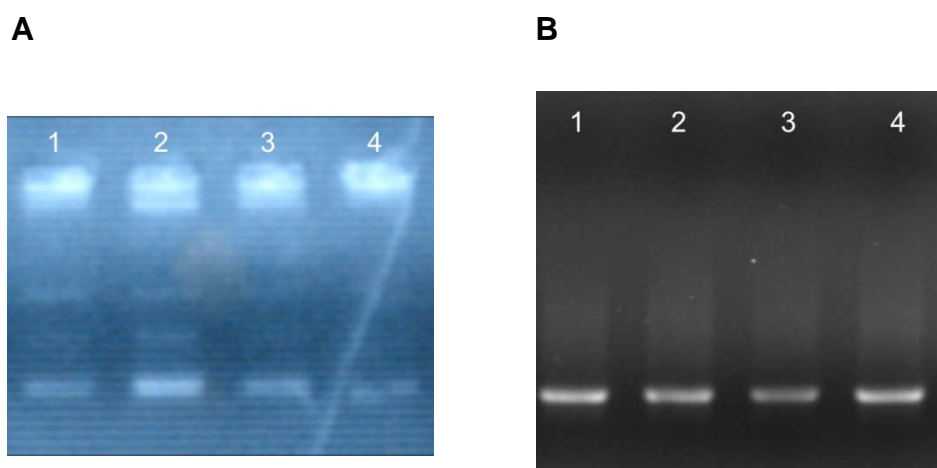


Figura 11. (A) Perfil eletroforético do DNA plasmidial purificado a partir dos clones transformantes contendo o fragmento de DNA correspondente da amostra C39 e (B) da PCR empregando o DNA plasmidial e os iniciadores universal e reverso.(B)

Os produtos provenientes da PCR e aqueles clonados no vetor pGEM-T Easy foram submetidos ao seqüenciamento automático no seqüenciador Megabace (Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília).

O fragmento de DNA amplificado pelo par de iniciadores ORF2/cesAB possui apenas 495pb de extensão, contemplando a maior parte da orf2 e também grande parte do gene *cesAB*. O resultado do seqüenciamento confirmou a presença de seqüências similares à orf2 e ao gene *cesAB* em ambos os isolados de DAEC. Valores de similaridade bastante elevados foram observados em relação às linhagens patógenas tanto de humanos como de bezerros e coelhos.

Novamente foi possível verificar um alto grau de similaridade com a linhagem de *Citrobacter rodentium*, confirmando assim o elevado grau de conservação dos genes TTSS em diferentes espécies de patógenos (Tabela 4).

TABELA 4: Análise de similaridade dos fragmentos de DNA gerados pelo par de iniciadores ORF2/cesAB.

gene/amostra	acesso	organismo	origem	identidade
ORF2/cesAB C39 (468 pb)	AB426060	EPEC O111:H ⁻	humanos	100% em 464nt
	AJ277443	STEC O26:H ⁻	bovinos	100% em 464nt
	AF453441	REPEC O15:H ⁻	coelhos	100% em 464nt
	AE005174	EPEC E2348/69 O127:H7	humanos	95% em 469nt
	AF022236	EHEC O157:H7 EDL933	humanos	95% em 469nt
	AF311901	<i>Citrobacter rodentium</i>	murinos	85% em 463nt
ORF2/cesAB C74 (449 pb)	AB426060	EPEC O111:H ⁻	humanos	98% em 434nt
	AJ303141	EHEC O103:H2	bovinos	98% em 434nt
	AJ277443	STEC O26:H ⁻	bovinos	98% em 434nt
	AF022236	EPEC E2348/69 O127:H7	humanos	93% em 435nt
	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humanos	93% em 435nt
	AF311901	<i>Citrobacter rodentium</i>	murinos	83% em 437nt

Os escores de similaridade observados em relação às amostras C39 e C74 foram bastante próximos. A realização de um alinhamento múltiplo entre as seqüências relativas às nossas amostras e aquelas de maior escore de similaridade encontradas nos bancos de dados, além de EPEC E2348/69 e *C. rodentium* (Figura 12) revela que as linhagens O26:H⁻ e O111:H⁻ assemelham-se mais entre si e em relação às nossas amostras. Nota-se também que a amostra C74 difere em apenas 13 nucleotídeos, aproximadamente 2,92%, em relação à amostra C39. Tal observação deve ainda ser confirmada por meio de novos seqüenciamentos de tais DNAs.

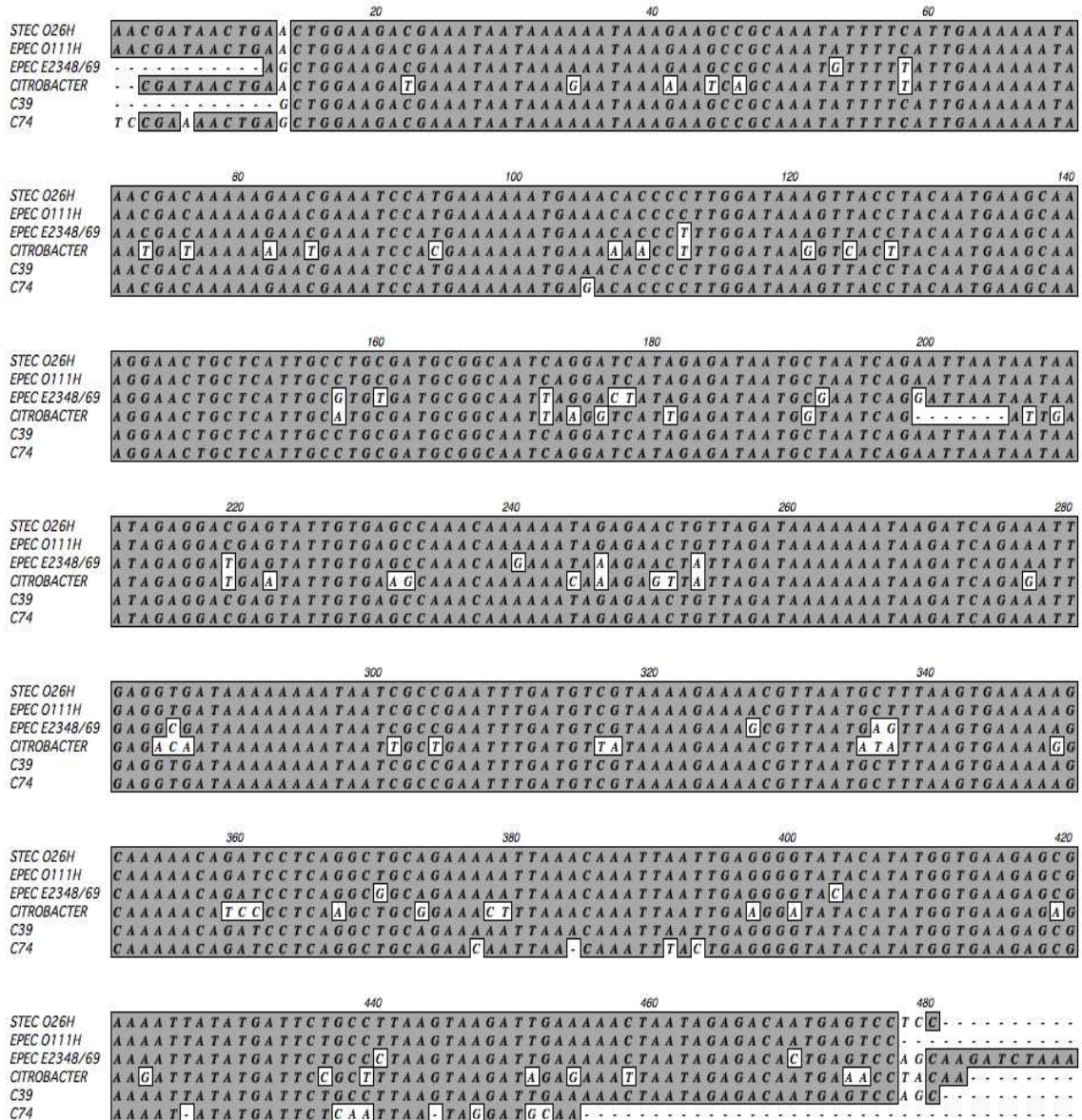


Figura 12. Alinhamento múltiplo entre as seqüências nucleotídicas relativas à orf2/cesAB de STEC O26:H⁻, EPEC O111:H⁻, EPEC E2348/69, *Citrobacter rodentium* e das amostras C39 e C74.

3.3. Detecção e caracterização dos prováveis genes *escR* e *escT* e *sepQ*

Os genes *escR*, *escT*, pertencentes ao operon LEE1 em EPEC 2348/69, codificam componentes estruturais do TTSS. As proteínas EscR e EscT ancoram-se à membrana interna bacteriana, conferindo sustentação ao aparato de secreção (Figura 5). Tampakaki *et al.* (2004) demonstraram que a morfologia

dessas proteínas estruturais é bastante similar em *Yersinia*, *E. coli* e *Pseudomonas syringae*, reforçando que o TTSS é conservado em várias espécies. O gene *sepQ*, contido no operon LEE2, codifica uma proteína estrutural do TTSS que se localiza na base do complexo. Embora sua função exata não tenha sido elucidada até o momento, estudos recentes sugerem que o gene seja renomeado, passando a denominar-se *escQ* devido a sua similaridade com o gene *YscQ* de *Yersinia* spp (Pallen *et al.*, 2005), que forma o anel interno junto ao corpo basal do TTSS (Jakson & Plano, 2000).

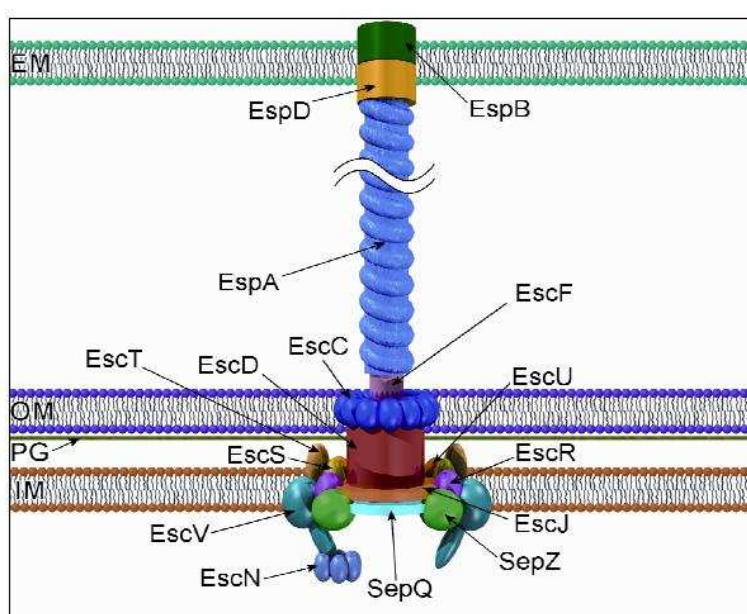


Figura 13. Representação esquemática do TTSS de EPEC e EHEC. Localização das proteínas EscR, EscS, EscT e SepQ na região basal do aparato. IM, membrana interna; PG, peptidoglicano; OM, membrana externa; EM, membrana eucariótica. (Pallen *et al.*, 2005).

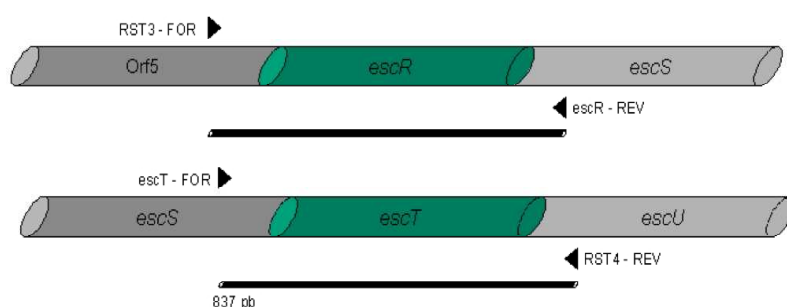
3.3.1. Experimentos de PCR

Trabalhos previamente realizados por nosso grupo (Kyaw, 2004) resultaram na amplificação de um fragmento de DNA correspondente aos prováveis genes *escR*, *escS* e *escT*, empregando um par de iniciadores denominados RST3 e RST4, que tinham como regiões flanqueadoras a *orf5* e o gene *escU* (Figura 11). No entanto, como não foi possível clonar tal fragmento de DNA, foram realizados novos experimentos de PCR, empregando outros

conjuntos de iniciadores, denominados RST3/escR rev para o provável gene *escR*, e *escT* for/RST4 para o provável gene *escT*, na tentativa de clonar tais genes (Figura 14a).

As reações utilizando como molde o DNA da amostra C39 foram positivas na temperatura de anelamento de 50°C com os pares RST3/RST4, RST3/escR rev e também *escT* for/RST4, que geraram fragmentos de DNA de aproximadamente 1757pb, 714pb e 837pb, respectivamente (Figura 14b).

A



B

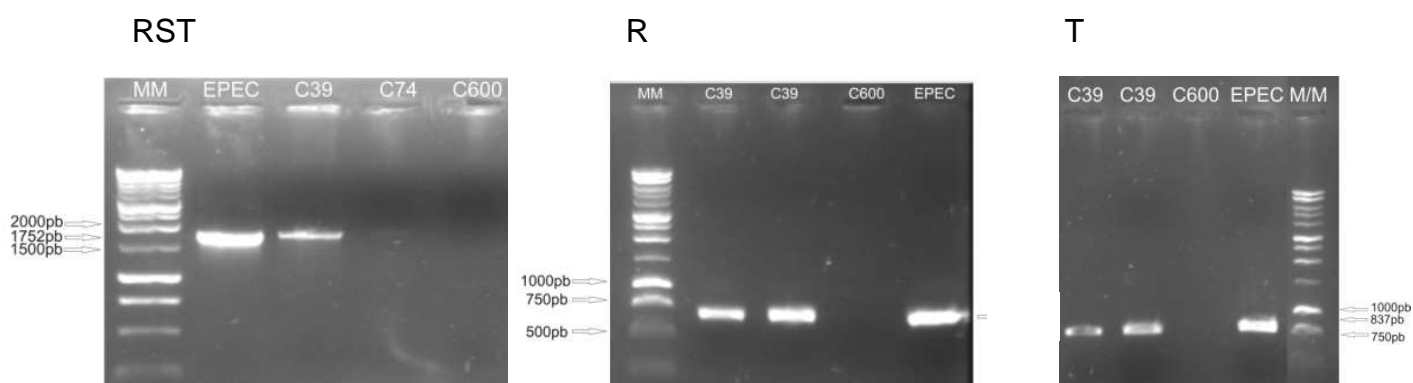


Figura 14. (A) Diagrama esquemático dos genes *escR* e *escT* e suas regiões flanqueadoras em EPEC E2348/69. São assinaladas as seqüências iniciadoras utilizadas neste trabalho e o tamanho do fragmento esperado na amplificação. (B) Análise eletroforética dos produtos de PCR, empregando os iniciadores RST3 for e RST4 rev, RST3 for/escR rev e *escT* for/RST4 rev, a partir do DNA extraído da amostra C39 e dos controles negativo C600(K12) e positivo E2349/68. MM: Marcador de massa molecular 1kb DNA Ladder.

Em relação à amostra C74 não foi possível obter o produto em quantidade suficiente para seqüenciamento e clonagem com o par de iniciadores RST3/RST4. No caso do provável gene *escR* obtivemos um fragmento de DNA de

tamanho esperado, empregando 50°C como temperatura de anelamento. No intuito de avaliarmos a eficiência de amplificação em outras faixas de temperatura, submetemos o DNA da amostra C74 a uma PCR empregando um gradiente de temperatura, que resultou na amplificação de um fragmento de DNA em todas as temperaturas (figura 15A). Outros ensaios de PCR foram realizados usando os iniciadores específicos para o provável gene *escT*, mas estes resultaram na amplificação de mais de um fragmento de DNA. Por esta razão, foi realizado um experimento de PCR empregando gradiente de temperatura, que também resultou na amplificação de mais de um fragmento de DNA. Assim, foi necessário realizar a purificação do fragmento de tamanho esperado a partir do gel de agarose (figura 15B). Todos os produtos das reações de PCR foram então purificados e quantificados para utilização nos procedimentos subsequentes.

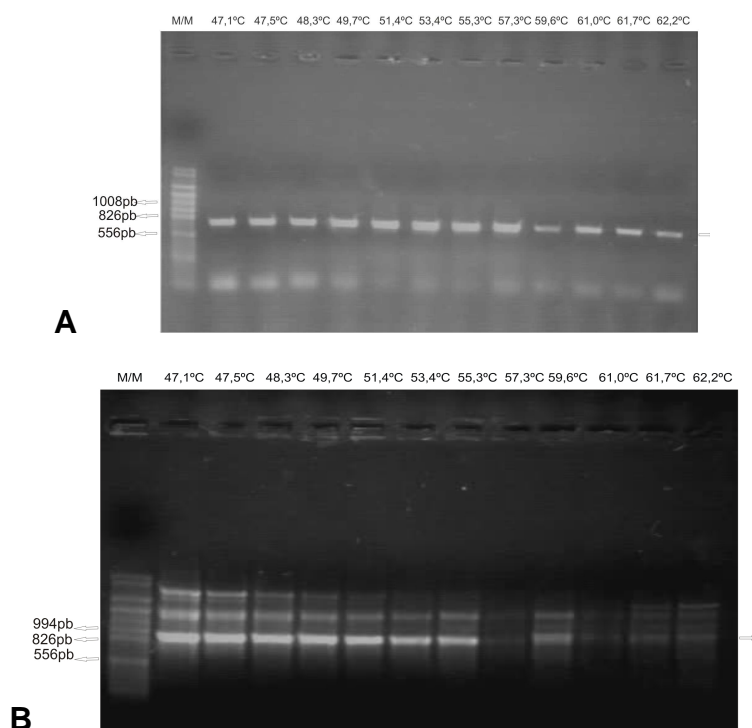


Figura 15. Análise eletroforética dos produtos de PCR em gradiente de temperatura, empregando os iniciadores RST3/*escR* rev (A) e *escT* for/RST4, a partir do DNA extraído da amostra C74(B).

A amplificação do provável gene *sepQ* a partir do DNA da amostra C39, foi realizada empregando-se 50°C como temperatura de anelamento, os iniciadores *sepQ*-for/*sepQ*-rev, a qual gerou um fragmento de DNA de aproximadamente

740pb (Figura 16). No caso da amostra C74, praticamente não houve amplificação nesta temperatura. Em uma PCR com gradiente de temperatura, foi possível amplificar o fragmento relativo ao provável gene *sepQ*, apesar da amplificação de outros fragmentos inespecíficos. Por esta razão, foi necessário realizar a purificação do fragmento de tamanho esperado a partir de um gel de agarose. Todos os produtos de amplificação foram purificados e eluídos, sendo posteriormente utilizados nas reações de seqüenciamento e clonagem.

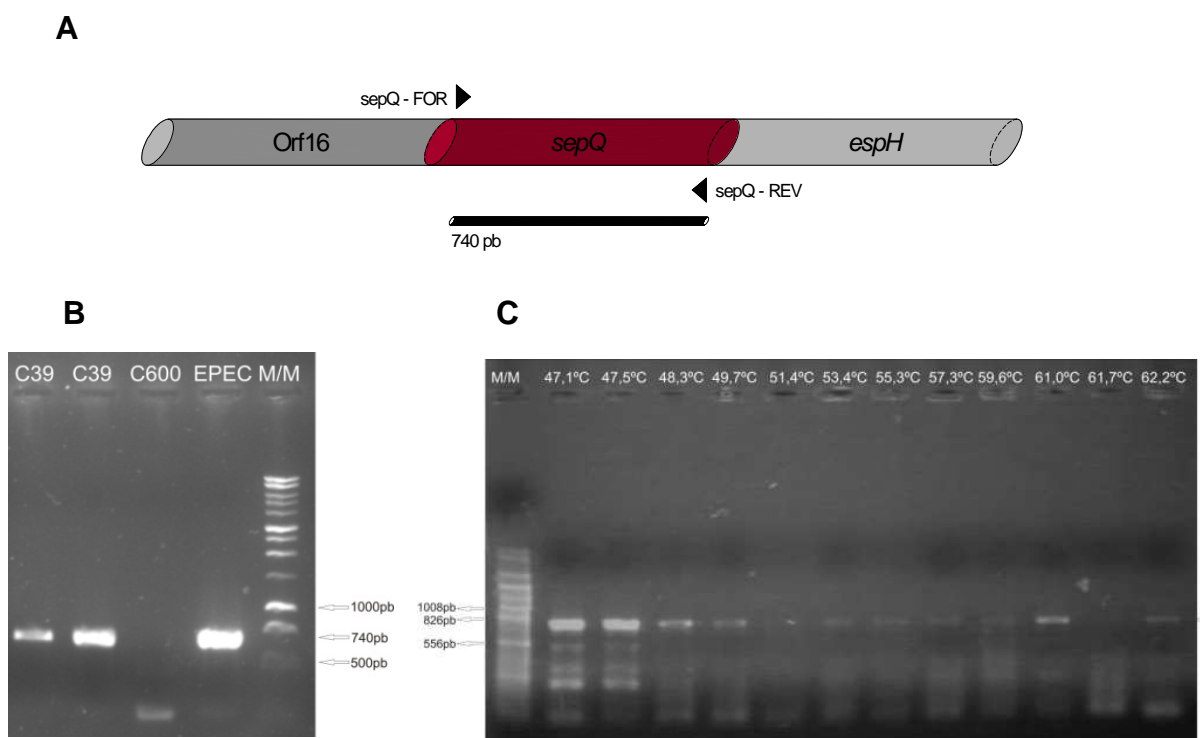


Figura 16. Diagrama esquemático do gene *sepQ* e suas regiões flanqueadoras em EPEC E2348/69. São assinaladas as seqüências iniciadoras utilizadas neste trabalho e o tamanho do fragmento esperado na amplificação (A). Análise eletroforética dos produtos de PCR, empregando os iniciadores *sepQ-for/ sepQ-rev*, a partir do DNA extraído da amostra C39 e dos controles negativo C600(K12) e positivo E2349/68 (B). Análise eletroforética dos produtos de PCR em gradiente de temperatura, empregando os iniciadores *sepQ-for/ sepQ-rev*, a partir do DNA extraído da amostra C74(C).

3.3.2. Seqüenciamento e caracterização dos produtos de PCR

3.3.2.1. Provável gene *escR*.

Os fragmentos de DNA provenientes da amostra C39 foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e células competentes da linhagem DH5- α foram transformadas. Quatro colônias brancas, provavelmente contendo o inserto, foram selecionadas e submetidas à extração de DNA plasmidial e PCR com os iniciadores Universal e Reverso, a fim de confirmarmos a presença do inserto (Figura 17). Para a amostra C74, os fragmentos provenientes das diversas PCRs foram purificados, quantificados e submetidos diretamente ao seqüenciamento com os iniciadores específicos RST3 for/ *escR* rev.

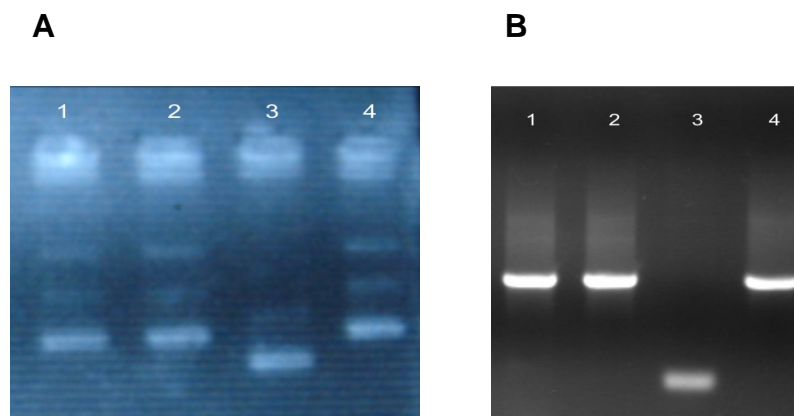


Figura 17. (A) Perfil eletroforético do DNA plasmidial purificado a partir dos clones transformantes contendo fragmento de DNA de C39 e (B) da PCR empregando o DNA plasmidial, e os iniciadores Universal e Reverso.

O seqüenciamento dos fragmentos de DNA amplificados a partir do DNA das amostras C39 e C74 revelou que estes consistem no provável gene *escR* completo, flanqueado por pequenas seqüências correspondentes à *orf5* e ao gene *escS*. Notamos que o gene *escR* mantém-se bastante conservado nas várias linhagens de *E. coli* isoladas de humanos, bovinos e coelhos, com valores de 100% de identidade entre essas linhagens e a amostra C39, e de até 96% para a amostra C74 (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise de similaridade dos fragmentos de DNA gerados pelo par de iniciadores RST3 for/ escR rev.

gene/amostra	acesso	Organismo	origem	identidade
escR/C39 (816 pb)	AB426060	EPEC O111:H ⁻	humanos	100% em 816nt
	AJ277443	STEC O26:H ⁻	bovinos	100% em 816nt
	AF453441	REPEC O15:H ⁻	coelhos	100% em 816nt
	AF022236	EPEC E2348/69 O127:H7	humanos	96% em 818nt
	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humanos	96% em 818nt
	AF311901	<i>Citrobacter rodentium</i>	murinos	88% em 818nt
escR/C74 (680 pb)	AB426060	EPEC O111:H ⁻	humanos	96% em 670nt
	AJ277443	STEC O26:H ⁻	bovinos	96% em 670nt
	AF453441	REPEC O15:H ⁻	coelhos	96% em 670nt
	AF022236	EPEC E2348/69 O127:H7	humanos	94% em 672nt
	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humanos	94% em 672nt
	AF311901	<i>Citrobacter rodentium</i>	murinos	86% em 673nt

O alinhamento entre as proteínas EscR de EPEC O111:H⁻, STEC O26:H⁻, REPEC O15:H⁻ e EPEC E2348/69 e a proteína predita do provável gene *escR* das amostras C39 e C74 revela que o fragmento de DNA obtido contém o provável gene *escR* completo na amostra C39 (Figura 18). Nota-se que as proteínas são altamente conservadas nos diferentes isolados sendo EPEC O111:H⁻, STEC O26:H⁻, REPEC O15:H⁻ e a DAEC C39 idênticas. Embora haja diferenças em relação à sequência nucleotídica do gene *escR* entre EPEC E2348/69 e as demais amostras, as proteínas diferem em apenas um aminoácido na posição 109, ocorrendo a substituição de uma isoleucina por fenilalanina.

A sequência do provável gene *escR* da amostra C39 foi depositada no banco de dados GenBank sob o número de acesso EU715411.

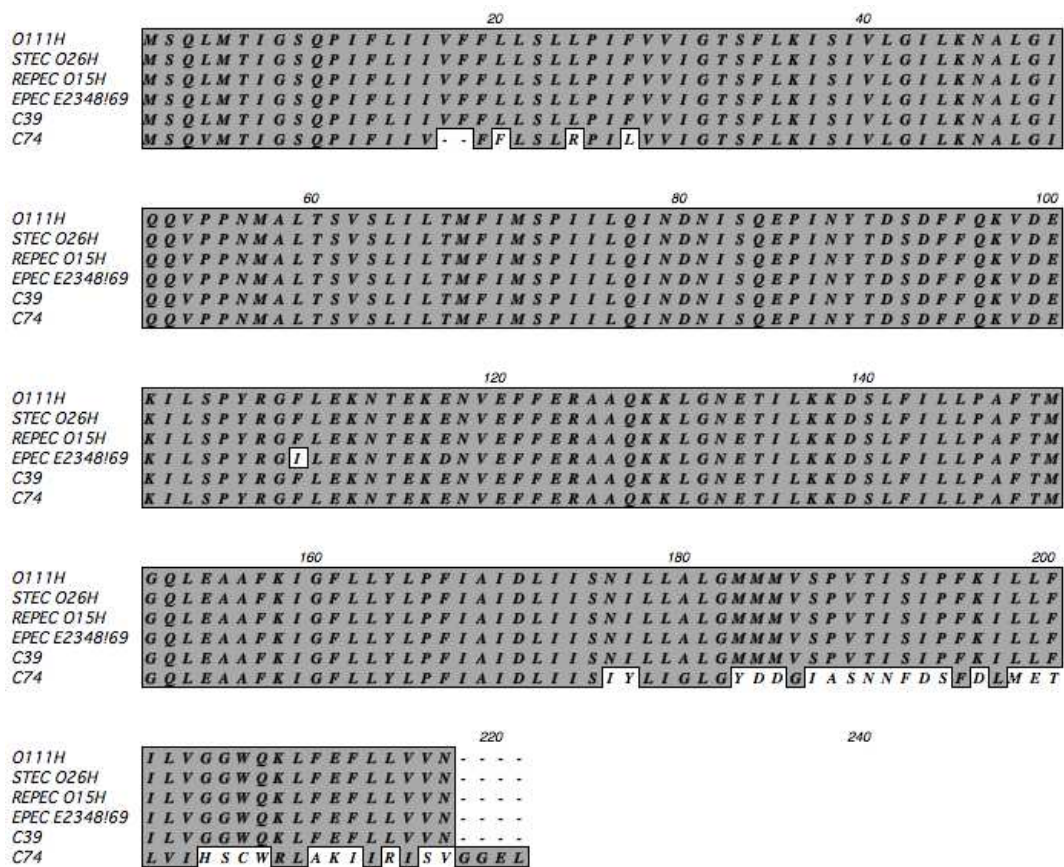


Figura 18. Alinhamento múltiplo entre a proteína EscR de EPEC O111:H⁻, STEC O26:H⁻, REPEC O15:H⁻ e EPEC E2348/69 e a proteína predita das amostras C39 e C74.

3.3.2.2. Provável gene *escT*

O DNA originado das PCR realizadas com a amostra C39 foi utilizado para clonagem e utilizado na transformação de células competentes da linhagem DH5- α . Pelo menos seis colônias brancas provavelmente contendo o inserto, foram selecionadas e submetidas à extração de DNA plasmidial. Após PCR com os iniciadores Universal e Reverso, confirmamos a presença do inserto em três das colônias selecionadas (Figura 19). Já para a amostra C74, os produtos das diversas PCRs foram purificados, quantificados e submetidos diretamente ao seqüenciamento com os iniciadores específicos *escT* for/ RST4.

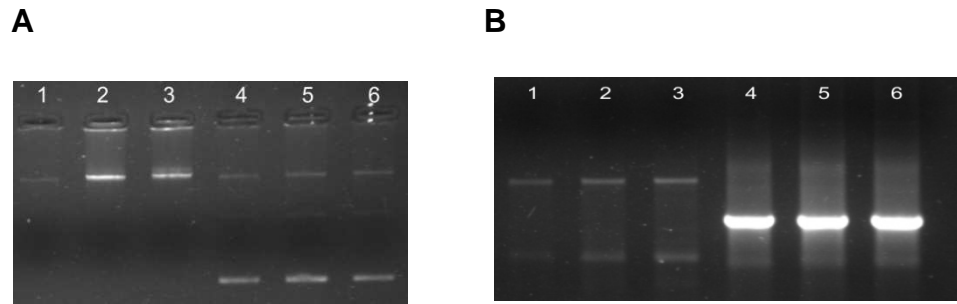


Figura 19. (A) Perfil eletroforético do DNA plasmidial purificado a partir dos clones transformantes contendo fragmento de DNA da amostra C39 e (B) da PCR empregando o DNA plasmidial, e os iniciadores Universal e Reverso.

Os resultados das análises das seqüências pelos programas BLAST e FASTA, estão resumidas na tabela 6. Estes revelam que o seqüenciamento do fragmento de DNA amplificado pelo par de iniciadores escT-for/RST4, a partir do DNA da amostra C39 resultou em 99% de identidade em relação a amostras isoladas de humanos e de bovinos. O resultado do seqüenciamento da amostra C74 revelou valores de identidade menores, em torno de 87%. É importante ressaltar que esse resultado menor de identidade provavelmente advém da qualidade inferior obtida no seqüenciamento.

Tabela 6 – Análise de similaridade dos fragmentos de DNA gerados pelo par de iniciadores *escT* for/ RST4 rev.

gene/amostra	acesso	organismo	origem	identidade
<i>escT</i> /C39 (753 pb)	AB426060	EPEC O111:H ⁻	humanos	99% em 754nt
	AJ303141	EHEC O103:H2	bovinos	99% em 754nt
	AJ277443	STEC O26:H ⁻	bovinos	99% em 754nt
	AF022236	EPEC E2348/69 O127:H7	humanos	95% em 754nt
	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humanos	94% em 754 nt
	AF311901	<i>Citrobacter rodentium</i>	murinos	87% em 755 nt
<i>escT</i> /C74 (656 pb)	AB426060	EPEC O111:H ⁻	humanos	87% em 662nt
	AJ303141	EHEC O103:H2	bovinos	87% em 662nt
	AJ277443	STEC O26:H ⁻	bovinos	87% em 662nt
	AF200363	REPEC O15:H ⁻	coelhos	87% em 662nt
	AF022236	EPEC E2348/69 O127:H7	humanos	86% em 588nt
	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humanos	85% em 589nt

A partir do alinhamento dos fragmentos de DNA correspondentes ao provável gene *escT* das amostras de DAEC com os genes que apresentaram maior identidade (Figura 20), observamos que a identidade não foi de 100% entre C39 e EPEC O111:H⁻ e STEC O26:H devido à presença de uma citosina na posição 718 e um *gap* na posição 796. Para a amostra C74 podemos notar também divergência em mais de 100 nucleotídeos, além de algumas inserções de bases, provavelmente decorrentes de uma menor qualidade da seqüência gerada. Para o provável gene *escT* da amostra C39, o fragmento correspondeu quase à totalidade do gene, faltando apenas cerca de 21 pares de bases do início do gene.

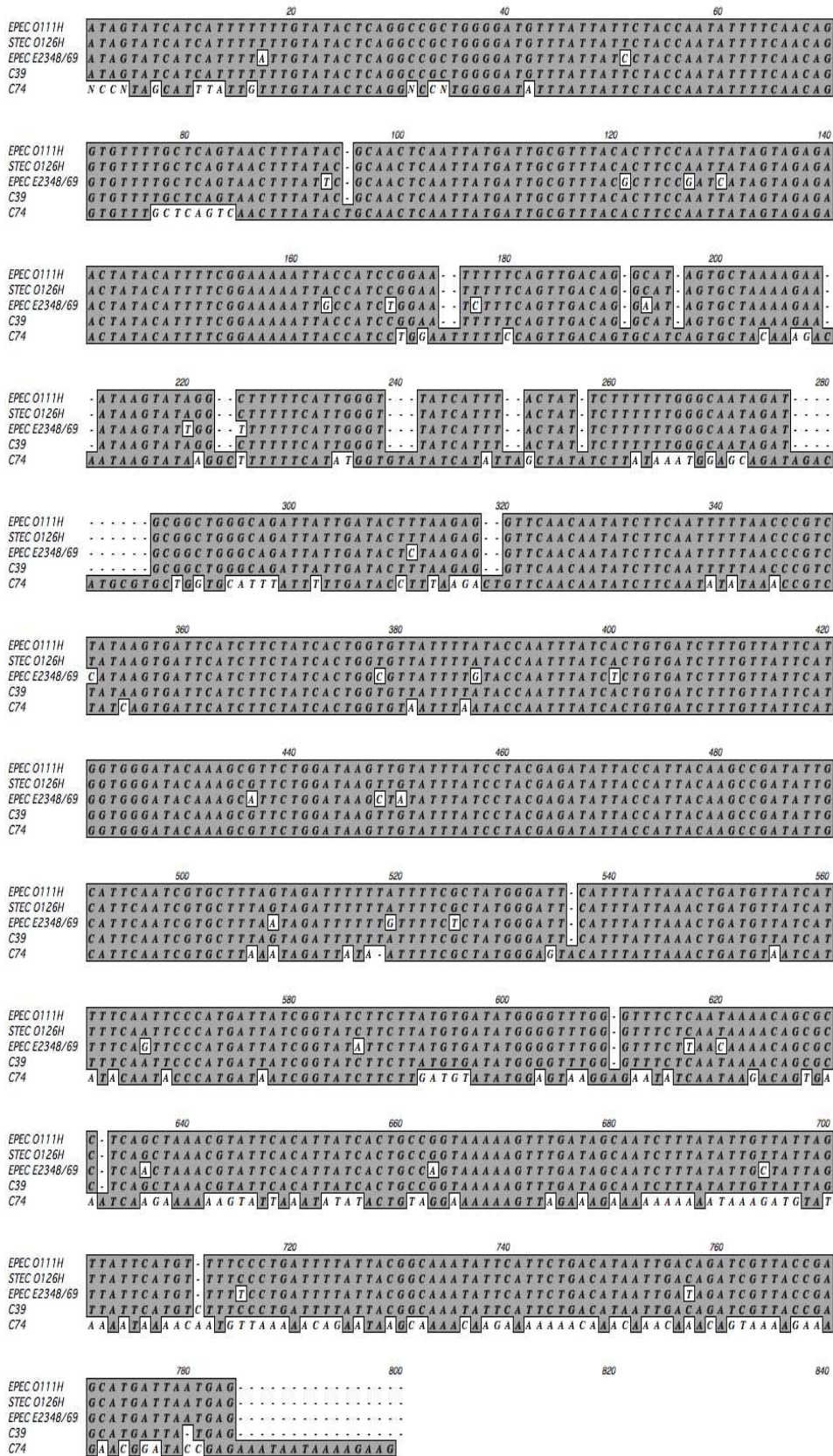


Figura 20. Alinhamento múltiplo entre as seqüências nucleotídicas do gene *escT* de EPEC O111:H⁷, STEC O26:H⁷, EPEC E2348/69 e os fragmentos de DNA obtidos a partir da amplificação do DNA das amostras de DAEC C39 e C74.

3.3.2.3. Provável gene *sepQ*

Conforme os procedimentos realizados anteriormente, os fragmentos de DNA obtidos nas PCRs com a amostra C39 para os fragmentos obtidos foram utilizados para clonagem e transformados em células competentes da linhagem DH5- α . Numa primeira etapa foram selecionadas cinco colônias provavelmente contendo o inserto e submetidas à extração de DNA plasmidial (Figura 21A). Em outro procedimento, mais duas colônias foram submetidas à extração de DNA plasmidial (figura não mostrada). O DNA plasmidial extraído das sete colônias foi submetido a PCR com os iniciadores Universal e Reverso, confirmando a presença do inserto em três das colônias selecionadas (Figura 21B). Os fragmentos de DNA provenientes da amostra C74 foram purificados, quantificados e submetidos diretamente ao seqüenciamento.

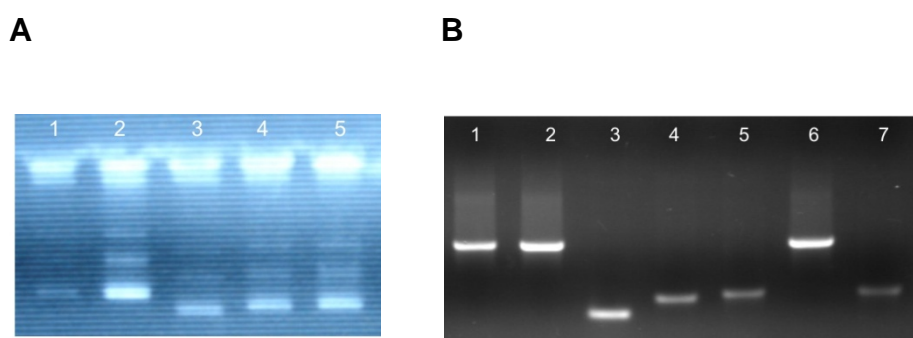


Figura 21. (A) Perfil eletroforético do DNA plasmidial purificado a partir dos clones transformantes contendo fragmento de DNA correspondente da amostra C39 e (B) da PCR empregando o DNA plasmidial e os iniciadores universal e reverso.

Os resultados das análises de similaridade empregando o provável gene *sepQ* são apresentados na Tabela 7. Valores elevados de identidade foram observados em ambas as amostras, atingindo quase 100% em relação às linhagens STEC O26:H⁻ de origem bovina e EPEC 0111: H⁻ humana. Observamos um menor grau de identidade entre as DAECs e a linhagem EPEC E2348/69 de usada como referência para confecção dos iniciadores e EHEC EDL933, também utilizada nesse trabalho.

Tabela 7 – Análise de similaridade dos fragmentos de DNA gerados pelo par de iniciadores sepQ for/ sepQ rev.

gene/amostra	acesso	organismo	origem	identidade
sepQ/C39 (718 pb)	AJ277443	STEC O26:H ⁻	bovinos	99% em 719nt
	AJ303141	EHEC O103:H2	bovinos	99% em 719nt
	AB426060	EPEC O111: H ⁻	humanos	98% em 719nt
	AF022236	EPEC E2348/69 O127:H7	humanos	89% em 725nt
	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humanos	88% em 718 nt
	AF311901	<i>Citrobacter rodentium</i>	murinos	84% em 708 nt
sepQ/C74 (704 pb)	AJ277443	STEC O26:H ⁻	bovinos	98% em 714nt
	AB426060	EPEC O111: H ⁻	humanos	98% em 714nt
	AJ303141	EHEC O103:H2	bovinos	97% em 714nt
	AF022236	EPEC E2348/69 O127:H7	humanos	88% em 720nt
	AE005174	EHEC O157:H7 EDL933	humanos	87% em 720 nt
	AF311901	<i>Citrobacter rodentium</i>	murinos	84% em 653 nt

O alinhamento das seqüências correspondentes ao provável gene *sepQ* de DAEC com os genes homólogos de maior identidade (figura 22), revela que o gene *sepQ* da linhagem EPEC O111:H⁻ diverge em apenas 2 nucleotídeos em relação à C39. As amostras C39 e C74 apresentam grande similaridade, exceto pela deleção de oito nucleotídeos na amostra C74 e a divergência em três bases.

4. Ensaio para expressão dos prováveis genes do TTSS de DAEC

Com o êxito obtido ao constatarmos a presença de alguns prováveis genes TTSS nas amostras C39 e C74, iniciamos os ensaios de extração de RNA e transcrição reversa, no intuito de investigar se tais seqüências correspondiam, de fato, a genes funcionais.

Uma vez que a expressão de genes TTSS ainda não foi descrita em DAEC, buscamos informações sobre as condições para a indução da expressão dos genes TTSS em outros organismos. De maneira geral, os ensaios relatam que o uso de condições similares às encontradas *in vivo*, promovem a expressão destes genes. Kenny *et al.*, (1997) relataram que, para EPEC, uma condição similar à encontrada no trato gástrico seria eficiente para indução. Segundo Francis *et al.*, (2002), a temperatura parece ser em parâmetro chave para a indução de fatores de virulência de *Shigella* e *Yersinia*. Em *Shigella*, o aumento da temperatura para 37°C, há a indução do ativador transcricional VirF, semelhante ao AraC, resultando na ativação de uma cascata regulatória mediada por VirB, que irá ativar os genes requeridos para montagem do TTSS e secreção dos substratos envolvidos na invasão celular e disseminação do microrganismo (Tobe *et al.*, 1991). Em consenso a outros grupos de trabalho, Ando *et al.* (2007) relatam que a expressão e secreção de fatores de virulência são altamente reguladas e respondem a estímulos ambientais como o pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes.

4.1. Indução da expressão dos prováveis genes do TTSS de DAEC.

Estabeleceu-se as condições de cultivo para as amostras escolhidas, visando à manutenção do pH em torno de 7,5 e a temperatura em 37°C. Alguns trabalhos relatam o uso de DMEM como o meio de cultura mais propício para crescimento e expressão, porém, após testes, obtivemos melhores resultados utilizando o meio LB tamponado com Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5.

A partir de inóculos das amostras EHEC EDL 933, EPEC 2348/69, C39 e C74 crescidos em meio LB por uma noite, sob agitação, a 37°C, utilizamos uma

alíquota de 50 µL de cada cultura que foi transferida para tubos contendo 5 mL de meio LB tamponado com Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5. Para cada amostra, foram preparados 5 tubos, um para cada tempo de indução, conforme descrito no item 6.2 dos Materiais e Métodos. Após, procedemos a extração do RNA total (Figura 23) com o kit “TRIzol® Reagent”.

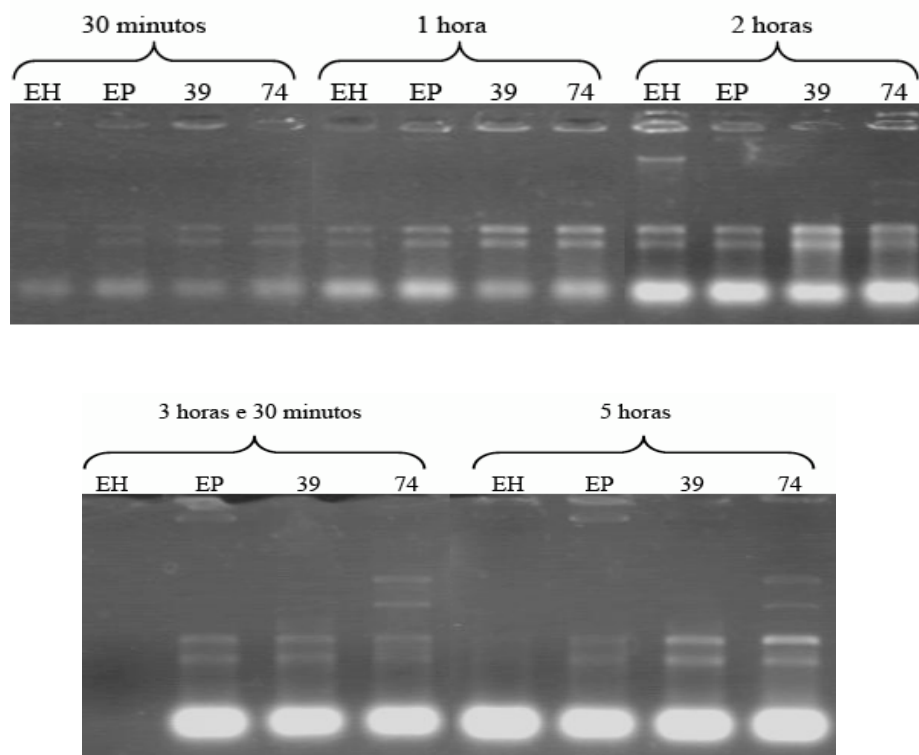


Figura 23. Perfis eletroforéticos dos RNAs extraídos de C39 e C74 e dos controles positivos EHEC EDL933 e EPEC E2348/69. São apresentados os tempos de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 30 minutos e 5 horas de indução da expressão dos genes LEE.

Após a extração procedeu-se tratamento para a eliminação de qualquer traço de DNA contaminante. Para tanto, utilizamos a enzima DNase I *Amplification grade* (Invitrogen), na proporção de 1 µL (uma unidade) por 1 µg de RNA. Em seguida, realizamos PCR nas mesmas condições dos ensaios anteriores com DNA, com temperatura de anelamento de 51°C e como molde, o RNA tratado para confirmação do tratamento com DNase I. (Figura 24). O par de iniciadores N1/N2, tem como alvo parte do gene *escN*, que codifica uma ATPase, cuja atividade é necessária durante a montagem e secreção das proteínas do

TTSS (revisado por Gálan e Wolf-Watz, 2006). Os resultados obtidos revelaram que o tratamento com DNase I foi bem sucedido, uma vez que não foi possível evidenciar qualquer produto de amplificação a partir dos vários RNAs testados.

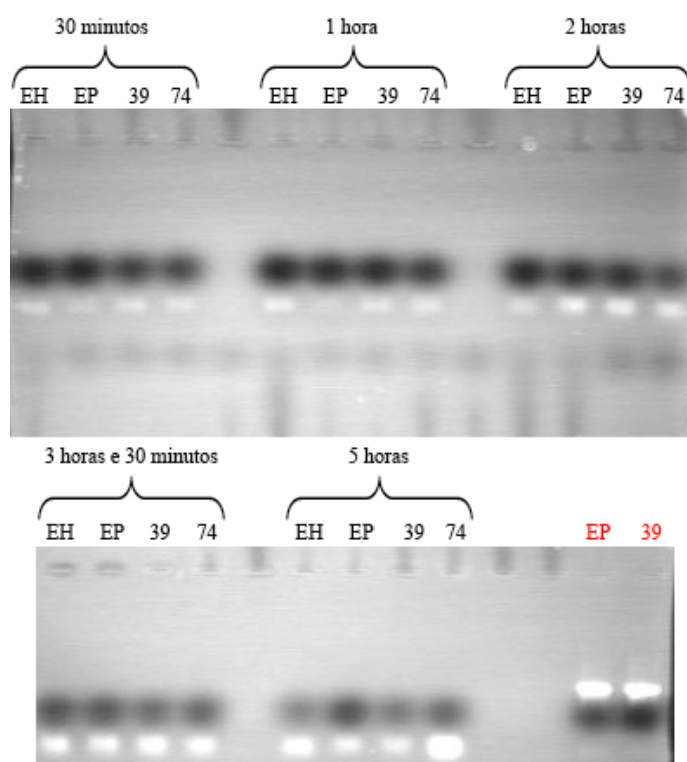


Figura 24. Perfil eletroforético dos produtos amplificados pelo par de iniciadores N1/N2, após tratamento com DNase I, empregando como moldes os RNAs de C39 e C74, EHEC EDL933 e EPEC E2348/69, extraídos nos cinco tempos de indução. Em vermelho os controles positivos com DNA das amostras EPEC e C39.

O RNA tratado obtido foi utilizado como molde para as reações de RT-PCR em condições livre de RNase, e o cDNA resultante foi utilizado em ensaios de PCR com os pares de iniciadores para os genes *cesAB*, *escT* e *escR*, objeto deste estudo. Como controle da expressão dos RNAs utilizamos o par de iniciadores GAP F/GAP R, direcionados ao gene que codifica a enzima da via glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, de expressão constitutiva, além do par de iniciadores N1/N2.

4.2. Análise da expressão dos prováveis genes do TTSS de DAEC em condições de indução.

As primeiras análises da expressão dos genes TTSS foram feitas por PCR, com o uso dos iniciadores *escR/RST3* que, nos ensaios anteriores, gerou um fragmento de DNA correspondendo ao gene *escR* completo, e ainda com os iniciadores N1/N2 que, como mencionado anteriormente, amplifica parte do gene *escN*, uma importante ATPase. Análises de expressão gênica da linhagem Sakai de EHEC O157:H7 realizados por Dahan *et.al.*, 2004, demonstraram a presença de *escN* em tempos iniciais e tardios de indução. Por esta razão, empregamos os iniciadores N1/N2, pois julgamos ter uma maior chance de observar a expressão do gene *escN*.

A Figura 25 indica que o fragmento de DNA obtido na PCR apresentava o tamanho esperado, de aproximadamente 856 pb. No entanto, a expressão foi bastante diferenciada entre as amostras e, contrariamente ao observado por Dahan e colaboradores (2004), verificamos uma baixa eficiência de amplificação. Para EPEC, observamos amplificação somente aos 30 minutos e após duas horas de indução. No tempo de uma hora, não houve amplificação a partir de qualquer amostra. O dado mais expressivo é observado em relação à amostra C39, onde observamos amplificados em quase todos os tempos de indução exceto em 1 hora e curiosamente, o oposto nota-se com a amostra C74, que não gerou produtos em nenhum dos tempos de indução.

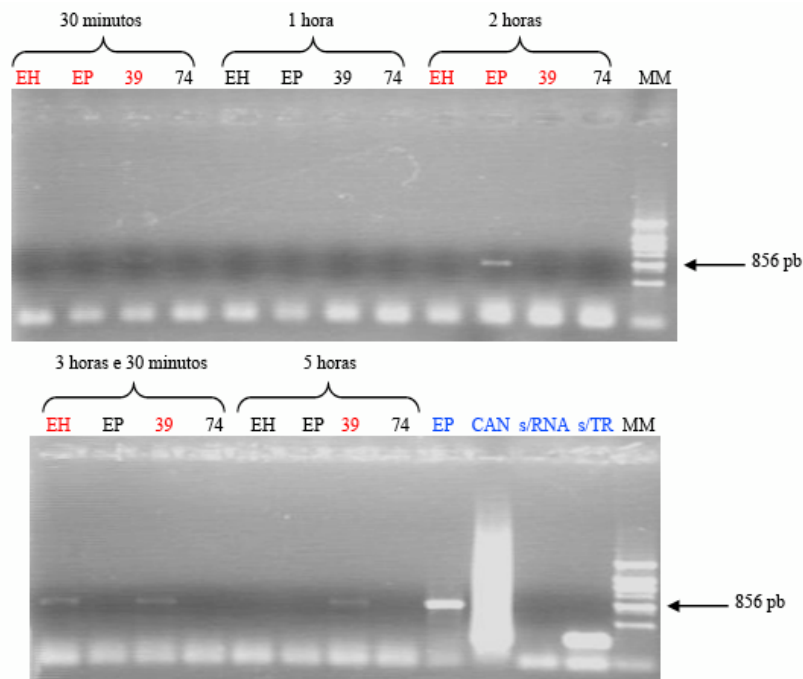


Figura 25. Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de iniciadores N1/N2, a partir do cDNA das amostras EHEC, EPEC, C39 e C74 nos diferentes tempos de indução. Em azul o controle positivo da PCR, EP(DNA de EPEC), e os controles da RT, positivo CAN(canamicina) e negativos s/RNA (sem RNA) e s/TR (sem transcriptase reversa). M/M TTSS Ladder.

A PCR com iniciadores direcionados ao gene *escR* resultou na amplificação de produtos em diversos tempos de indução, com resultados melhores que os observados com o par de iniciadores N1/N2. Podemos notar a presença de fragmentos de aproximadamente 714pb em todas as amostras, em todos os tempos de indução com exceção da amostra C74, que novamente não gerou qualquer DNA amplificado (Figura 26).

Estes primeiros resultados podem indicar uma provável diferença nos mecanismos de regulação da expressão dos genes do TTSS em relação às amostras C39 e C74 e também aos controles. O fato do resultado de expressão para amostra C74 ser tão distinto, pode corroborar os resultados obtidos nos ensaios anteriores de PCR com DNA genômico, onde observamos que os produtos das amplificações desta, possuíam um menor grau de similaridade em relação à amostra C39, talvez sugerindo uma origem distinta do TTSS.

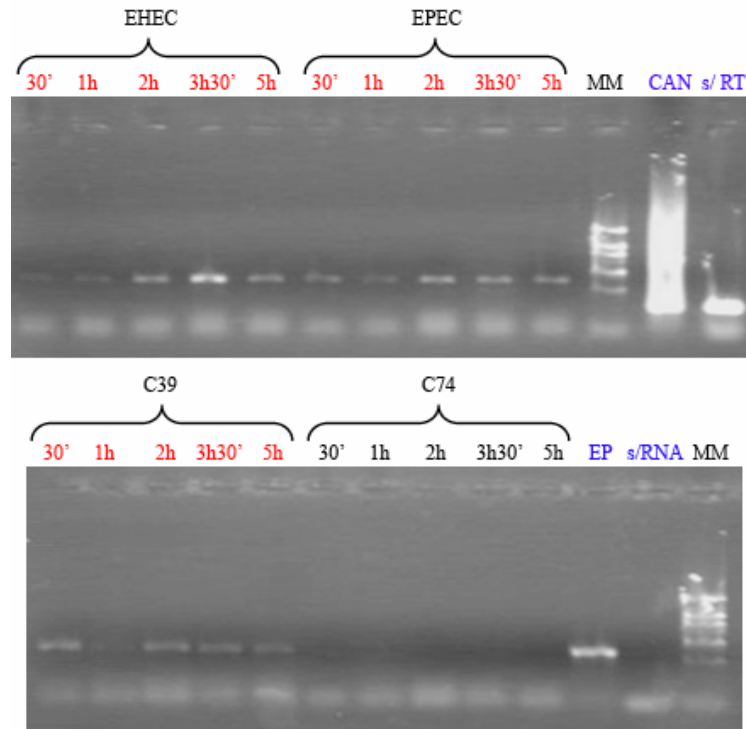


Figura 26. Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de iniciadores escR rev/RST3 com o cDNA das amostras controle EHEC, EPEC, C39 e C74 nos diferentes tempos de indução. Em azul o controle positivo da PCR, EP(DNA de EPEC), e os controles da RT, positivo CAN(canamicina) e negativos sem RNA e sem transcriptase reversa. M/M TTSS Ladder

Para observar a eficiência da indução e de transcrição dos genes de nossas amostras de DAEC e dos controles, uma nova RT-PCR foi realizada, porém deixamos como amostra controle apenas a EPEC 2348/69 por esta ter sido usada como molde para o desenho dos pares de iniciadores. Desta vez realizamos a PCR com uma temperatura de anelamento de 52°C, usando o cDNA das amostras com o par de iniciadores GAP F e GAP R. Esta PCR demonstrou que a indução nos diversos tempos propiciou a transcrição do gene de interesse, inclusive para amostra C74, revelando que o experimento de transcrição reversa havia funcionado satisfatoriamente (Figura 27).

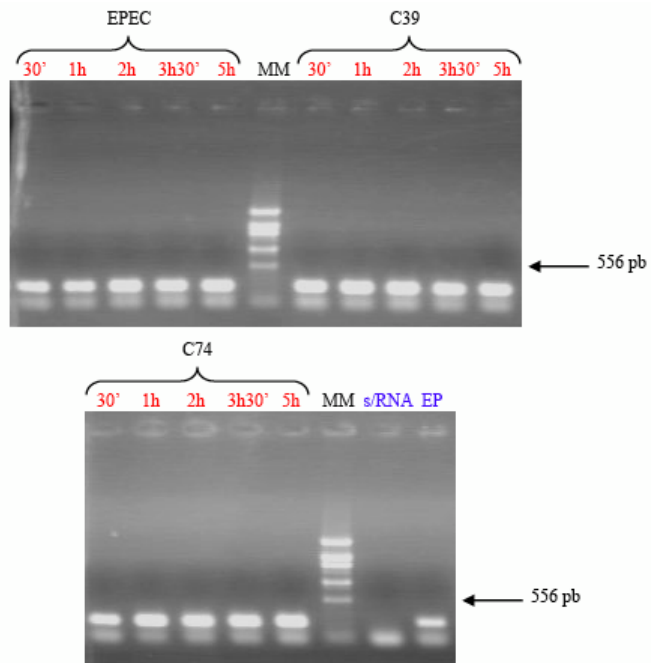


Figura 27. Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de iniciadores GAP F e GAP R a partir do cDNA da amostra controle EPEC, C39 e C74 nos diferentes tempos de indução. Controle negativo s/RNA (sem RNA), controle positivo EP (EPEC). M/M TTSS DNA Ladder.

Uma nova PCR foi realizada com o par de iniciadores N1/N2 (Figura 28), utilizando uma temperatura de anelamento inferior, 46°C. Os resultados revelaram a presença de produtos de amplificação apenas nos tempos de 30 minutos, 2h e 5 horas de indução para o controle EPEC, sendo este perfil também observado para a amostra C39. Já para a amostra C74 novamente não observamos a presença de fragmentos de DNA amplificados.

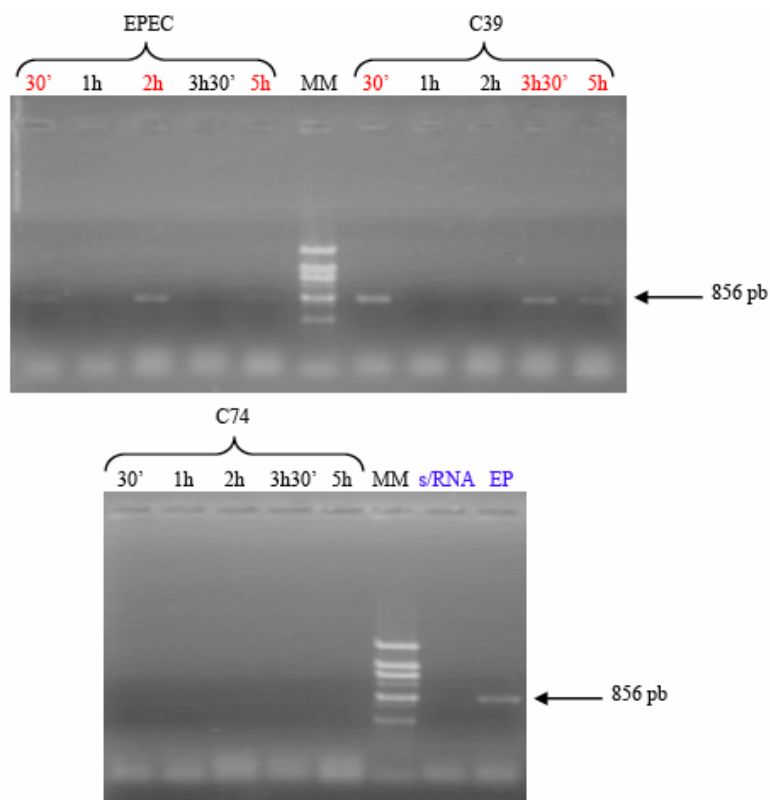


Figura 28. Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de iniciadores N1 e N2 a partir do cDNA da amostra controle EPEC, C39 e C74 nos diferentes tempos de indução. Controle negativo s/RNA (sem RNA), controle positivo EP (EPEC). M/M TTSS Ladder.

Em uma nova PCR com os iniciadores escR rev/ RST3, usando uma temperatura de anelamento de 52°C, detectamos a produção de segmentos de DNA de tamanho esperado em todos os tempos de indução, exceto com 30 minutos, para as amostras EPEC, C39 e também para amostra C74, apesar de notadamente menos eficiente. Nesse caso, o aumento de temperatura de anelamento em apenas 2°C parece ter sido crucial para a eficiência da amplificação do cDNA da amostra C74. (Figura 29)

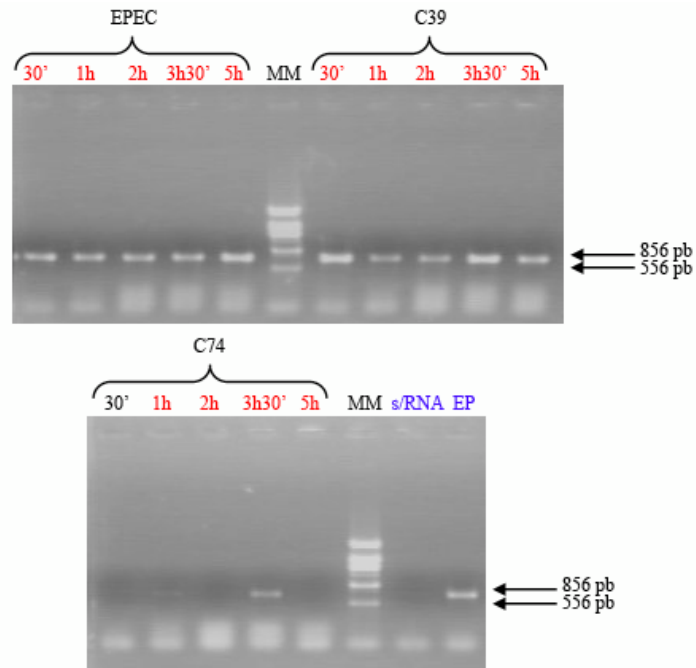


Figura 29. Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de iniciadores RST3 / escR rev a partir do cDNA da amostra controle EPEC, C39 e C74 nos diferentes tempos de indução. Controle negativo s/RNA (sem RNA), controle positivo EP (EPEC). M/M TTSS DNA Ladder.

Diante destes resultados, outros pares de iniciadores que previamente haviam amplificado fragmentos de DNA relativos aos genes do TTSS em nossas amostras de DAEC foram testados, especificamente os pares orf3/cesAB e escT for/ RST4.

No caso do gene *cesAB*, com uma temperatura de anelamento de 51°C, apenas a amostra controle EPEC gerou fragmentos de DNA de tamanhos esperado em todos os tempos de indução (figura 30).

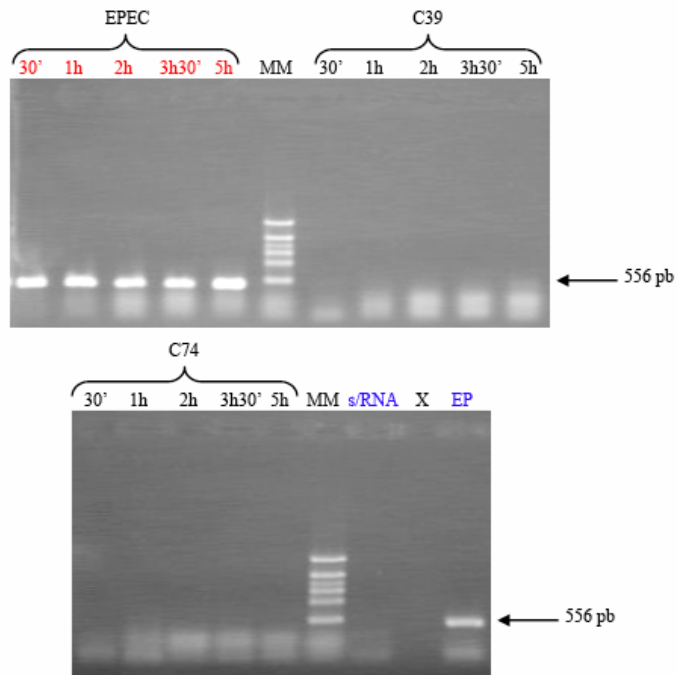


Figura 30. Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de iniciadores *cesAB for/orf3 rev* a partir do cDNA da amostra controle EPEC, C39 e C74 nos diferentes tempos de indução. Controle negativo s/RNA (sem RNA), controle positivo EP (EPEC). M/M TTSS DNA Ladder

Os resultados obtidos com os iniciadores *escT for/RST4*, a 51°C, revelaram que houve a expressão do gene *escT* em todos os tempos de indução para as amostras EPEC e C39. Em relação à amostra C74, observou-se a geração de produtos de amplificação apenas no tempo de indução de 3 horas e meia. (Figura 31).

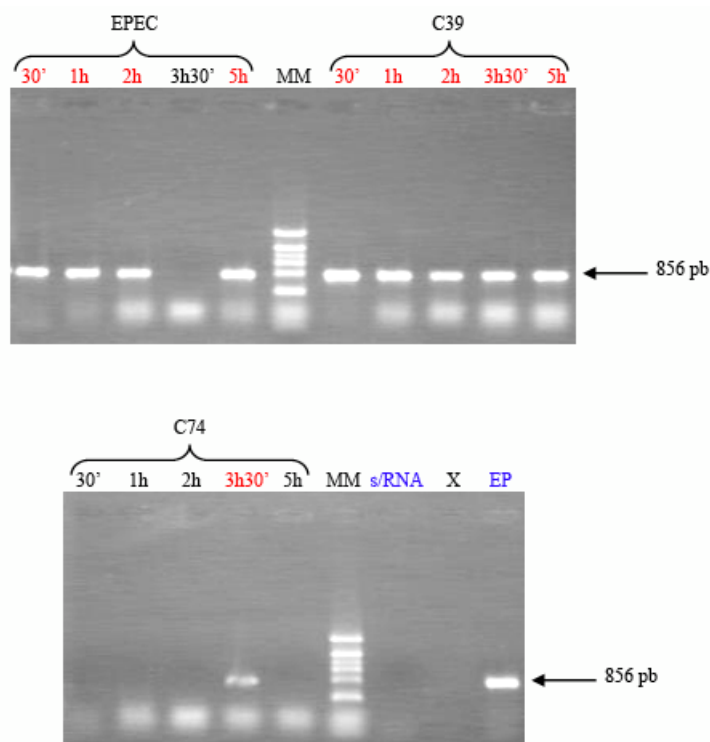


Figura 31. Perfil eletroforético dos produtos amplificados o par de iniciadores *escT* for/*RST4* a partir do cDNA da amostra controle EPEC, C39 e C74 nos diferentes tempos de indução. Controle negativo s/RNA (sem RNA), controle positivo EP (EPEC). M/M TTSS DNA Ladder

De maneira geral, podemos inferir que as amostras C39 e C74 de DAEC expressam os genes TTSS *escN*, *escR*, *cesAB* e *escT*. Porém, notadamente observamos comportamentos distintos tanto nos tempos de indução entre as amostras, como também na eficiência das amplificações utilizando o cDNA como molde. Assim, novos experimentos devem ser realizados a fim de otimizarmos os tempos e condições de indução para cada amostra. Entretanto, nossos resultados sugerem fortemente que as amostras de DAEC utilizadas neste trabalho possuem um TTSS funcional.

4.3. Análise da expressão dos prováveis genes do TTSS de DAEC na ausência de condições de indução.

Para finalizar os experimentos de expressão, realizamos as etapas de extração de RNA, eliminação do DNA contaminante e RT-PCR das amostras EPEC, C39 e C74 na ausência de condições de indução (tempo zero de indução),

a fim de avaliarmos se os prováveis genes TTSS estavam sendo expressos constitutivamente, ou se havia mesmo indução. Para isso, as amostras foram cultivadas em meio LB não tamponado. Os resultados dos experimentos de PCR mostram que para os iniciadores dirigidos aos genes *cesAB*, *escR*, *escT* (Figura 32) não houve a expressão dos genes no tempo zero.

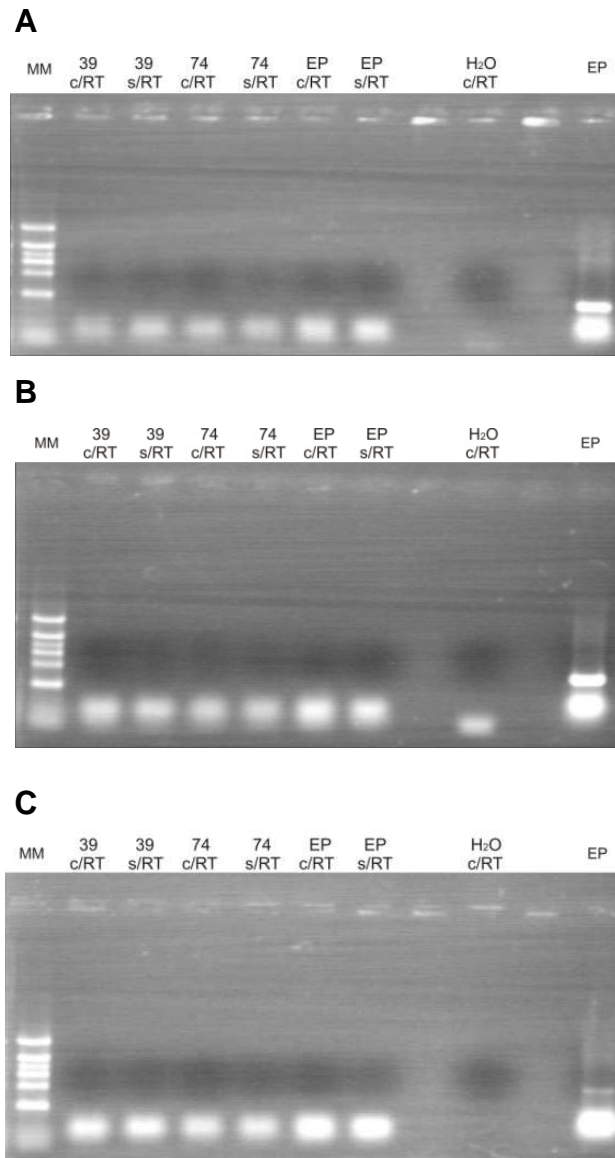


Figura 32. Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de iniciadores *cesAB* for/orf3 rev, RST3/*escR* rev, *escT* for/RST4 a partir do cDNA de EPEC, C39 e C74 nos diferentes tempos de indução. Controle negativo s/RNA (sem RNA), controle positivo EP (EPEC). M/M TTSS DNA Ladder

Já para o gene constitutivo GAP, podemos observar que este estava sendo expresso no tempo zero conforme o esperado, mas, não em todas as amostras. Para a amostra C74 não houve amplificação, o que pode indicar algum problema na condição de indução ou de amplificação.

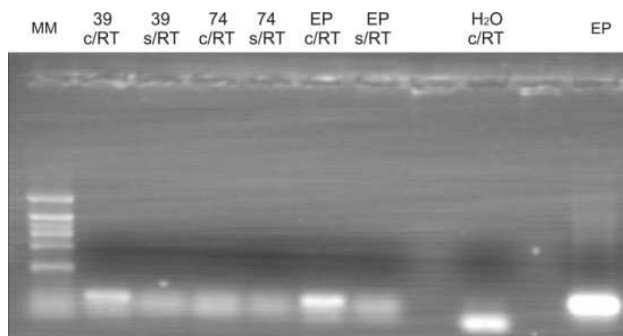


Figura 33. Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de iniciadores GAP F/GAP R a partir do cDNA de EPEC, C39 e C74 no tempo zero de indução. M/M TTSS DNA Ladder.

Conclusões

Este trabalho permitiu a identificação, em amostras de DAEC, das prováveis *rorf1* e *orf2*, além dos possíveis genes *cesAB*, *escR*, *escT* e *sepQ*, componentes do TTSS, com organização semelhante à de outros organismos.

- as amostras C39 e C74 apresentam padrões distintos de amplificação em relação à temperatura de anelamento

- escores de similaridade de 100% foram obtidos nas análises dos prováveis *rorf1*, *orf2/cesAB* e *escR* para a amostra C39 e linhagens de EPEC, EHEC, STEC.

- as amostras C39 e C74 apresentam maior similaridade com linhagens isoladas de coelhos e bovinos para a *rorf1*. Os prováveis genes *cesAB*, *escR*, *escT*, apresentam similaridade maior com linhagens obtidas de humanos e bovinos sendo esses genes os mais conservados nas linhagens analisadas. Já o provável *sepQ* apresenta maior similaridade com linhagens de origem bovina do que humana.

- O provável gene *escR* de tamanho completo, foi obtido para amostra C39 e sua seqüência depositada no banco de dados GenBank sob o número de acesso EU715411.

- Foi possível clonar os fragmentos de DNA relativos aos genes *rorf1*, *orf2/cesAB*, *escR*, *escT* e *sepQ* obtidos da amostra C39, visando futuras análises.

- Os prováveis genes *cesAB*, *escR*, *escT* e *escN* são transcritos quando culturas são submetidas a condições de indução *in vitro*.

- As análise de expressão revelou padrões de expressão distintos entre as amostras C39 e C74.

Perspectivas:

- Caracterização e clonagem dos demais genes que compõem TTSS.
- Caracterizar o operon LEE5, pois este contém os genes codantes de fatores de virulência indutores da lesão A/E causada por EPEC, não presente em DAEC.
- Aperfeiçoar as condições de indução da transcrição de genes do TTSS.
- Detecção de proteínas do TTSS.
- Obtenção de fragmentos completos de componentes do Complexo Agulha através de Microscopia Eletrônica e Microscopia de Força Atômica.

Referências Bibliográficas

- ABE, A.; HECZKO, U.; HEGELE, R.G.; FINLAY, B. B. (1998) Two Enteropathogenic *Escherichia coli* Type III Secreted Proteins, EspA and EspB, Are Virulence Factors. *Journal of Experimental Medicine*, **10**:1907-1916.
- AIZAWA, S. (2001) Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol. Lett.*, **202**:157-164.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, **25**:3389–3402.
- AN, H.; FAIRBROTHER, J.M.; DÉSAUTELS, C.; MABROUK, T.; DUGOURD, D.; DEZFULIAN, H.; HAREL, J. (2000) Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. *Microb. Pathog.*, **28**:291–300.
- ANDO, H.; ABE, H.; SUGIMOTO, N.; TOBE, T. (2007) Maturation of functional type III secretion machinery by activation of anaerobic respiration in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology*, **153**:464-473.
- BAQUI, A.H.; SACK, R.B.; BLACK, R.E.; HAIDER, K.; HOSSAIN, A.; ALIM, A.R.; YUNUS, M.; CHOWDHURY, H.R.; SIDDIQUE, A.K. (1992) Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children less than 5 years of age. *J. Infect. Dis.*, **166**:792-796.
- BENZ, I. and SCHMIDT, M. A. (1989) Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **57**:1506-1511.
- BHAN, M.K., RAL, P., LEVINE, M.M., KAPER, J.B., BHANDARY, N., SRIVASTAVA, R., KUMAR, R. AND SAZAWAL, S. (1989) Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J. Infect. Dis.*, **159**: 1061-1064.
- BILGE, S.S.; CLAUSEN, C.R.; LAU, W.; MOSELEY, S.L. (1989) Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J. Bacteriol.*, **171**:4281-9.
- BLANC-POTARD, A.B.; TINSLEY, C.; SCALETSKY, I.; LE BOUGUÉNEC, C.; GUIGNOT, J.; SERVIN, A.L.; NASSIF, X.; BERNET-CAMARD, M.F. (2002) Representational difference analysis between Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* and nonpathogenic *E. coli* K-12. *Infect. Immun.*, **70**:5503–5511

- BLANCO, J.; CID, D.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; QUITEIRA, J.A.R.S.; FUENTE, R. (1996) Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs in Spain. *Veterinary Microbiol.*, **49**:209-217.
- BROWN, J.S.; GILLILAND, S.M.; HOLDEN, D.W. (2001) A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol. Microbiol.*, **40**:572-85.
- CAMPOS, L.C.; VIEIRA, M.A.; TRABULSI, L.R.; DA SILVA, L.A.; MONTEIRO-NETO, V.; GOMES, T.A. (1999) Diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC) strains of fecal origin rarely express F1845 adhesin. *Microbiol. Immunol.*, **43**:167-70.
- CHAKRABORTY, T.; HAIN, T.; DOMANN, E. (2000) Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *Int. J. Med. Microbiol.*, **290**:167-74.
- CHAPMAN, T.A.; WU, X. Y.; BARCHIA, I.; BETTELHEIM, K.A.; DRIESEN, S.; TROTT, D.; WILSON, M. and CHIN, J.J.-C. (2006) Comparison of Virulence Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy and Diarrheic Swine. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 4782-4795.
- CHENG, L. W. & SCHNEEWIND, O. (2000) Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends Microbiol.*, **8**:214-220.
- CIRILLO, D. M.; HEFERNAN, E. J.; WU, L.; HARWOOD, J.; FIERER, J.; GUINEY, D. G. (1996) Identification of a domain in Rck, a product of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid, required for both serum resistance and cell invasion. *Infect Immun.*, **64**: 2019-2023.
- CLARKE, S.C.; HAIGH, R.D.; FREESTONE, P.P.E.; WILLIAMS, P.H. (2003) Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, **16**:365-378.
- COIA, J.E. (1998). Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immun. Med. Microbiol.*, **20**:1–9.
- CRAVIOTO A, GROSS RJ, SCOTLAND SM, ROWE B. (1979) An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol.*, **3**:95-99.
- CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFAN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. (1991) Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoeae. *Lancet*, **337**:262-264.

- CREASEY, E.A.; DELAHAY, R.M.; DANIELL, S.J.; FRANKEL, G. (2003a) Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, **149**:2093–2106.
- CREASEY, E.A.; FRIEDBERG, D.; SHAW, R.K.; UMANSKI, T.; KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; FRANKEL, G. (2003b) CesAB is an enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB. *Microbiology*, **149**:3639-3647.
- DAHAN, S.; KNUTTON, S.; SHAW, R.K.; CREPIN, V.F.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. (2004) Transcriptome of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 adhering to eukaryotic plasma membranes. *Infect. Immun.*, **72**:5452-5459.
- DANIELL, S. J.; TAKAHASHI, N.; WILSON, R.; FRIEDBERG, D.; ROSENSHINE, I.; BOOY, F. P.; SHAW, R. K.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G.; AIZAWA, S-I. (2001) The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.*, **3**:865-871
- DENG, W.; LI, Y.; VALLANCE, B.A.; BRETT FINLAY, B. (2001) Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect. Immun.*, **69**:6323-6335.
- DENG, W.; PUENTE, J.L.; GRUENHEID, S.; LI, Y.; VALLANCE, B.A.; VÁZQUEZ, A.; BARBA, J.; IBARRA, J.A.; O'DONNELL, P.; METALNIKOV, P.; ASHMAN, K.; LEE, S.; GOODE, D.; PAWSON, T.; BRETT FINLAY, B. (2004) Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**:3597–3602.
- DONNENBERG, M.S.; TACKET, C.O.; JAMES, S.P.; LOSONSKY, G.; NATARO, J.P.; WASSERMAN, S.S.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M. (1993) Role of the *eeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J. Clin. Invest.* **92**:1412-1417.
- DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B.; BRETT FINLAY, B. (1997) Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol.*, **5**:109-114.
- ELLIOT, S.J.; WAINWRIGHT, L.A.; McDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DENG, Y.K.; LAI, L.C.; McNAMARA, B.P.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.*, **28**:1-4.
- EWING, B.; HILLIER, L.D.; WENDL, M.C.; GREEN, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. Part I. Accuracy assessment. *Genome Res.*, **8**:175–185.

- FLECKENSTEIN, J.M.; LINDLER, L.E.; ELSINGHORST, E.A.; DALE, J.B. (2000) Identification of a gene within a pathogenicity island of enterotoxigenic *Escherichia coli* H10407 required for maximal secretion of the heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.*, **68**:2766-2774.
- FRANCIS, M.S.; WOLF-WATZ, H. and FORSBERG, A. (2002) Regulation of type III secretion systems. *Microb.*, **5**: 166-172.
- GALÁN, J.E. and COLLMER, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, **284**:1322-1328.
- GÁLÁN, J. E.; WOLF-WATZ, H. (2006) Protein delivery into eucaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, **444**:567-573.
- GARMENDIA, J.; FRANKEL, G. and CREPINT, V.F. (2005) Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. *Inf. And Immunity*, **73**:2573-2585.
- GAUTHIER, A.; PUENTE, J.L.; BRETT FINLAY, B (2003) Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect. Immun.*, **71**:3310-3319.
- GERMANI, Y., BEGAUD, E., DUVAL, P. & LE BOUGUENEC, C. (1996). Prevalence of enteropathogenic, enteroaggregative, and diffusely adherent *Escherichia coli* among isolates from children with diarrhea in New Caledonia. *J Infect Dis.*, **174**: 1124-1126.
- GIRÓN, J.A.; HO, A.S.Y.; SCHOOLNIK, G.K. (1991a) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**:710-713.
- GIRÓN, J.A.; JONES, T.; MILLAN-VELASCO, F.; CASTRO-MUÑOZ, E.; ZARATE, L.; FRY, J.; FRANKEL, G.; MOSELEY, S.L.; BAUDRY, B.; KAPER, J.B.; SCHOOLNIK, G.K.; RILEY, L.W. (1991b) Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. *J. Infect. Dis.*, **163**:507-513.
- GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; ABE, C. M.; RODRIGUES, D.; GRIFFIN, P. M.; RAMOS, S. R. T. S. (1998) Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, **36**:3609-3613.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.*, **8**:195–202.

- GUNZBURG, S.T.; CHANG, B.J.; ELLIOT, S. J.; BURKE, V.; GRACEY, M. (1993) Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* from aboriginal children from the Kimberley region of western Australia. *J. Infect. Dis.*, **167**:755-758.
- HACKER, J. and KAPER, J.B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**:641-679.
- HENDERSON, I.R.; CZECZULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J.P. (1999) Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **67**:5587-96.
- HUECK, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**:379-433.
- IDE, T.; LAARMANN, S.; GREUNE, H. S.; SCHILLERS, H.; OBERLEITHNER, H.; SCHMIDT, M. A. (2001) Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.*, **3**:669-679.
- JAKSON, M.W. and PLANO, G.V. (2000) Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiology Letters*, **186**: 85-90.
- JALLAT, C.; LIVRELLI, V.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; RICH, C.; JOLY, B. (1993) *Escherichia coli* strain involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. *J. Clin. Microbiol.*, **31**:2031-2037.
- JARVIS, K.G. and KAPER, J.B. (1996) Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect. Immun.*, **64**:4826-4829.
- JERSE, A.E; YU, J.; TALL, B.D.; KAPER, J.B. (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**:7839-7843.
- KAPER, J.B. (1998) Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Curr. Op. Microbiol.*, **1**:103-108.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev.*, **2**:123-140.
- KENNY, B.; ABE, A.; STEIN, M.; BRETT FINLAY, B. (1997) Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.*, **65**:2606-2612.

- KNUTTON, S.; SHAW, R.; PHILLIPS, A.D.; SMITH, H.R.; WILLSHAW, G.A.; WATSON, P. and PRICE, E. (2001) Phenotypic and Genetic Analysis of Diarrhea-Associated *Escherichia coli* Isolated From Children in the United Kingdom. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **33**: 32-40.
- KUBORI, T.; SUKHAN, A.; AIZAWA, S.I.; GALÁN, J.E. (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:10225-10230.
- KYAW, C.M.; DE ARAUJO, C.R.; LIMA, M.R.; GONDIM, E.G.S.; BRÍGIDO, M.M.; GIUGLIANO, L.G. (2003) Evidence for the presence of a type III secretion system in diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC). *Infect. Genet. Evol.*, **3**:111-117.
- (KYAW, C. M. (2004) Evidências da presença de um sistema de secreção do tipo III em isolados de *Escherichia coli* de adesão difusa (DAEC) Tese de Doutorado em Biologia Molecular - Universidade de Brasília.
- LAGE, A. P; CARVALHO, A. C. T; LEITE, R. C; YANO, T; SERAFIM, M. B. (1993) Toxigenic *Escherichia coli* in calves with diarrhea in Minas Gerais, Brazil. *Arq. bras. med. vet. zootec*; **45**(4):353-9
- LE BOUGUÉNEC, C.; SERVIN, A.L. (2006) Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett.*, **256**:185-194.
- LEVINE M.M. (1987) *Escherichia coli* cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis*; **155**: 377-389.
- LEVINE M.M.; PRADO, V.; ROBINS-BROWNE, R.; LIOR, H.; KAPER, J.B.; MOSELEY, S.L.; GICQUELAIS, R.; NATARO, J.P.; VIAL, P.; TALL, B. (1988) Use of DNA probes and HEp-2 cells adherence assay to detect diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, **158**:224-228.
- LINDSAY, J.A.; RUZIN, A.; ROSS, H.F.; KUREPINA, N.; NOVICK, R.P. (1998) The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.*, **29**:527-43.
- LOPES, L. M.; FABBRICOTTI, S. H.; FERREIRA, A. J. P.; KATO, M. A. M. F.; MICHALSKY, J.; SCALETSKY, I. C. A. (2005) Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, **43**:1968-1972.

- MENARD, L. P. & DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**, 43–60 (2002)
- MERAZ I.M., ARIKAWA K., OGASAWARA J., ET AL. (2006) Epithelial cells secrete interleukin-8 in response to adhesion and invasion of diffusely adhering *Escherichia coli* lacking Afa/Dr genes. *Microbiol Immunol*, **50**:159-69.
- MOON, H.W.; WHIPP, S.C.; ARGENZIO, R.A.; LEVINE, M.M. and GIANELLA, R.A. (1983) Attaching and Effacing Activities of Rabbit and Human Enteropathogenic *Escherichia coli* in Pig and Rabbit Intestines. *Infection and Immunity*, **41**:1340-1351.
- McDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**:1664-1668.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B.; ROBIN-BROWSE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M.M. (1987) Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *Pediatr Infect Dis.*, **6**:829-831.
- NATARO, J.P., KAPER J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.*, **11**:142-201.
- NOWICKI, B.; SELVARANGAN, R.; NOWICKI, S. (2001) Family of *Escherichia coli* Dr Adhesins: Decay-Accelerating Factor Receptor Recognition and Invasiveness. *J. Infect. Dis.*, **183**(Suppl. 1):S24–7.
- O' CONNELL, C.B.; CREASEY, E.A.; KNUTTON, S.; ELLIOTT, S.; CROWTHER, L.J.; LUO, W.; ALBERT, M.J.; KAPER, J.B.; FRANKEL, G. and DONNENBERG, M.S. (2004) SepL, a protein required for enteropathogenic *Escherichia coli* type III translocation, interacts with secretion component SepD. *Molecular Microbiology*, **52**(6): 1613-1625.
- OGURA, Y.; ABE, H.; KATSURA, K.; KUROKAWA, K.; ASADULGHANI, M.; IGUCHI, A.; OOKA, T.; NAKAYAMA, K.; YAMASHITA, A.; HATTORI, M.; TOBE, T. and HAYASHY, T. (2008) Systematic Identification and Sequence Analysis of the Genomic Islands of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Strain B171-8 by the Combined Use of Whole-Genome PCR Scanning and Fosmid Mapping. *J. of Bacteriology*, Vol.190, p. 6948-6960.
- OKEKE, I. N.; LAMIKANRA, A.; STEINRU, H.; KAPER, J. B. Characterization of *Escherichia coli* Strains from Cases of Childhood Diarrhea in Provincial Southwestern Nigeria. (2000). *J. Clin. Microbiol.* ,**38**: 7-12.
- PALLEN, M. J.; BEATSON, S. A.; BAILEY, C. M. (2005) Bioinformatic analysis of the locus of enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol.*, **5**:9-29.

- PEARSON, W.R. (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. In: *Doolittle, R.F. (Ed.), Methods in Enzimology*, vol. 183, Academic Press, San Diego, pp. 63–98.
- PERNA, N.T.; MAYHEW, G.F.; POSFAI, G.; ELLIOTT, S.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B.; BLATTNER, F.R. (1998). Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.*, **66**:3810–3817.
- PIVA, I.C. (1998) Incidência e caracterização de *Escherichia coli* enteroaderente, diarreogênica, isolada de Brasília. Tese de Mestrado em Biologia Molecular – Universidade de Brasília.
- PIZARRO-CERDÁ, J. and CROSSART, P. (2006) Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell*, **124**: 715-727.
- POITRINEAU, P.; FORESTIER, C.; MEYER, M.; JALLAT, C.; RICH, C.; MALPUECH, G.; DE CHAMPS, C. (1995). Retrospective case-control study of diffusely adhering *Escherichia coli* and clinical features in children with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, **33**:1961-1962.
- PRESCOTT, J. F. (1978). *Escherichia coli* and diarrhoea in the rabbit. *Veterinary Pathology*, **15**(2): 237-248
- RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.*, **308**:681-5.
- ROSA, A. C. P., MARIANO, A. T., PEREIRA, M. A. S., TIBANA, A., GOMES, T. A. T. & ANDRADE, J. R. C. (1998). Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol.*, **47**: 781-790.
- SANI, M.; ALLAOUI, A.; FUSETTI, F.; OOSTERGETEL, G. T.; KEEGSTRA, W.; BOEKEMA, E. J. (2006) Structural organization of the needle complex of the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Micron*, **38**:291-301.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 2001.
- SCALETSKY, I.C.A.; SILVA, M.A.; TRABULSI, L.R. (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.*, **43**:534-536.

- SCALETSKY, I.C.; PEDROSO, M.Z.; OLIVA, C.A.G.; CARVALHO, R.L.B.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. (1999) A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect. Immun.*, **67**:3410-3415.
- SCALETSKY, I.C.; FABBRICOTTI, S.H.; ARANDA, K.R.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. (2002a) Comparison of DNA hybridization and PCR assays for detection of putative pathogenic enteroadherent *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.*, **40**:1254-8.
- SCALETSKY, I.C.; FABBRICOTTI, S.H.; CARVALHO, R.L.B.; NUNES, C.R.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. (2002b) 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.
- SCHMIDT, H. and HENSEL, M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**:14-56.
- SHAW, R. K.; DANIELL, S.; EBEL, F.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. (2001) EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cell. Microbiol.*, **3**:213-222.
- SPANO, L.C.; SADOVSKY, A.D.I.; SEGUI, P.N.; SAICK, K.W.; KITAGAWA, S.M.S.; PEREIRA, F.E.L.; FAGUNDES-NETO, U. and SCALETSKY, C.A. (2008) Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children acute diarrhoea. *J. of Medical Microbiology*, **57**: 359-363.
- SPERANDIO, V.; MELLIES, J.L.; NGUYEN, W.; SHIN, S.; KAPER, J.B. (1999) Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:15196-15201.
- STUBER, K.; FREY, J.; BURNENS, A. P.; KUHNERT, P. (2002) Detection of type III secretion genes as a general indicator of bacterial virulence. *Mol. Cell. Probes.*, **17**:25-32.
- SWENSON, D.L.; BUKANOV, N.O.; BERG, D.E.; WELCH, R.A. (1996) Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: cosmid cloning and sample sequencing. *Infect. Immun.*, **64**:3737-3743.
- TACKET, C.O.; SZTEIN, M.B.; LOSONSKY, G.; ABE, A.; FINLAY, B.B.; McNAMARA, B.P.; FANTRY, G.T.; JAMES, S.P.; NATARO, J. P.; LEVINE, M.M. and DONNENBERG, M.S. (2000) Role of EspB in Experimental Human Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection. *Infect. Immun.*, **68**:3689-3695.

- TADDEI, C.R.; FASANO, A.; FERREIRA A. J. P.; TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. (2005) Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. *FEMS Microbiol. Lett.*, **250**:263–269.
- TAMANO, K., AIZAWA, S.; KATAYAMA, E.; NONAKA, T.; IMAJOH-OHMI, S.; KUWAE, A.; NAGAI, S.; SASAKAWA, C. (2000) Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J.*, **19**:3876–3887.
- TAMPAKAKI, A.P.; FADOULOGLOU, V.E.; GAZI, A.D.; PANOPOULOS, N.J.; KOKKINIDIS, M. (2004) Conserved features of type III secretion. *Cell. Microbiol.*, **6**:805-816.
- TAUSCHEK, M., STRUGNELL, R.A.; ROBINS-BROWNE, R.M. (2002). Characterization and evidence of mobilization of the LEE pathogenicity island of rabbit-specific strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **44**:1533–1550.
- THEIN, S. L., WALLACE, R, B. (1986). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders Human genetic diseases, a practical approach. IRL Press Oxford, 33-50.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.; (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, **22**:4673–4680.
- TOBE, T.; NAGAI, S.; OKADA, N; ADTER, B. ; YOSHIKAWA, M.; SASAKAWA, C.; Temperature-regulated expression of invasion genes in *Shigella flexneri* is controlled through the transcriptional activation of the virB gene on the large plasmid. *Molecular Microbiology*, **5**: 887-893
- TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T.A. (2002) Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**:508-13.
- WAINWRIGHT, L.A. and KAPER, J.B. (1998) EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **27**:1247–1260.
- WIELER, L.H.; McDANIEL, T.K.; WITTAM, T.S.; KAPER, J.B. (1997) Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiology Letters*, **156**: 49-53.
- WOLF, M.K. (1997) Occurrence, distribution, and association of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**:569-584.

YIP, C. K.; STRYNADKA, C. J. (2006) New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem. Sci.*, **31**:223-230.

ZHU, C.; AGIN, T.S.; ELLIOTT, S.J.; JOHNSON, L.A.; THATE, T.E.; KAPER, J.B.; BOEDEKER, E.C. (2001) Complete nucleotide sequence and analysis of the locus of enterocyte effacement from rabbit diarrheagenic *Escherichia coli* RDEC-1. *Infect. Immun.*, **69**:2107-2115.