

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, SEQUENCIAMENTO E  
ANOTAÇÃO DO GENOMA TOTAL DE UMA CEPA DE  
*Escherichia coli* ISOLADA DE UMA PACIENTE COM  
DOENÇA DE CROHN**

**Ana Carolina da Silva Santos**

**2015**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, SEQUENCIAMENTO E  
ANOTAÇÃO DO GENOMA TOTAL DE UMA CEPA DE  
*Escherichia coli* ISOLADA DE UMA PACIENTE COM  
DOENÇA DE CROHN**

**Ana Carolina da Silva Santos**

**Josias Rodrigues  
(Orientador)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

**BOTUCATU – SP  
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santos, Ana Carolina da Silva.

Caracterização fenotípica, sequenciamento e anotação do genoma total de uma cepa de Escherichia coli isolada de uma paciente com Doença de Crohn / Ana Carolina da Silva Santos. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Josias Rodrigues

Capes: 20202008

1. Crohn, Doença de. 2. Escherichia coli. 3. Virulência (Microbiologia). 4. Bioinvasão.

Palavras-chave: Anotação do genoma total; Doença de Crohn; Escherichia coli; Invasão; Virulência.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Silvio e Carla, cujo amor e apoio foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Deus, por ter sempre iluminado meu caminho e por abrir todas as portas para que eu chegasse onde eu estou hoje.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por serem sempre a minha maior inspiração e maior fonte de apoio e incentivo que eu poderia ter. Sem vocês nada disso seria possível.

Às minhas irmãs, Gabi e Luisa por todo amor, companheirismo, suporte e confiança. Aos meus tios, tias, avós, primos, e toda minha família pelo amor, apoio e torcida pela minha vitória.

Ao professor Dr. Josias Rodrigues, por todo o aprendizado dos últimos anos, pela confiança em meu trabalho, pela paciência e por dar todo suporte necessário para que este trabalho pudesse ser realizado.

Às minhas melhores amigas e irmãs de coração, Giovanna, Caroline e Vivian, pelo companheirismo e por estarem sempre ao meu lado.

À todos os meus colegas de laboratório que passaram pelo Laboratório de Bacteriologia Médica nos últimos anos, pela ajuda e suporte durante o meu trabalho, principalmente à Rogéria, Luis Fernando, Rie, Talita e, em especial, à Vanessa por toda ajuda e companheirismo de sempre.

À UNESP, em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Genética), pela oportunidade de aprendizado e crescimento dentro desta universidade. Aos docentes, servidores e técnicos do departamento de Microbiologia e Imunologia, onde este trabalho foi realizado.

À todos os amigos que eu fiz durante estes últimos dois anos, pelo companheirismo e por todo aprendizado compartilhado.

Ao Dr. Nicholas Barnich pelo envio da cepa AIEC LF82, essencial para o trabalho aqui apresentado. À Dra. Alexandrina Sartori e ao Dr. João Santana da Silva, por ter cedido a nós macrófagos da linhagem J774 para realização dos nossos trabalhos. À Dra Lígia Y.

Sasaki e ao Dr. Fernando G. Romero, pela contribuição primordial com amostras dos pacientes do Hospital das Clínicas de Botucatu.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), concessão da bolsa de estudos, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto FAPESP 2013/04475-3.

## RESUMO

A Doença de Crohn (DC) é uma variante das doenças inflamatórias intestinais que não tem uma causa definida, porém há o envolvimento de fatores ambientais e genéticos, entre eles a microbiota. Portadores da DC apresentam desequilíbrio na composição de espécies da microbiota intestinal, incluindo o aumento da *Escherichia coli*. A *E. coli* é uma bactéria versátil em sua relação com o hospedeiro, isto é, inclui cepas comensais e várias categorias patogênicas. Estas compreendem dois grupos: linhagens causadoras de infecções intestinais e linhagens causadoras de infecção extraintestinais. As *E. coli* isoladas de portadores da DC em geral pertencem ao segundo grupo, e uma das principais características apresentadas por estas bactérias é a interação com células epiteliais (aderência e invasão). Estudos feitos na década de 90 levaram a identificação de um novo patótipo de *E. coli*, capaz de aderir e invadir células epiteliais e ainda invadir e se replicar dentro de macrófagos, produzindo granulomas, característica histopatológica da DC. Este novo patótipo, chamado de *Adherent and Invasive E. coli* (AIEC), têm sido usada como referência na caracterização de *E. coli* isoladas a partir de portadores da DC. Neste trabalho, foi feito o estudo de caracterização fenotípica e genética de *E. coli* isoladas a partir de 9 portadores da DC e 5 pacientes controles, as quais foram submetidas a testes de adesão e invasão celular em células epiteliais, teste de formação de biofilme e identificação de filogrupos da coleção de referência de *E. coli* (EcoR). Dentre o conjunto de amostras bacterianas estudado, foi encontrada uma amostra isolada de uma paciente com DC que apresentou invasibilidade superior às demais, e foi intensivamente estudada, tendo-se verificado que ela apresenta um perfil de virulência distinto de AIEC. O genoma da amostra em questão foi sequenciado e anotado. Os resultados da caracterização fenotípica e análise genética preliminar são apresentados no trabalho que foi publicado em fevereiro de 2015 e o *draft* do genoma da amostra é apresentado no trabalho publicado em agosto de 2015.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACT: Artemis comparison tool

A/E: lesões do tipo *attaching and effacing*

AIEC: Adherent-invasive *E. coli*.

CDS: Coding sequence

DC: Doença de Crohn

DEC: *E. coli* diarreioagênica

DII: Doença Inflamatória Intestinal

EAEC: *E. coli* enteroagregativa

EcoR: cepas da coleção de referencia de *E. coli*

EHEC: *E. coli* enterohemorrágica

EIEC: *E. coli* enteroinvasora

ETEC: *E. coli* enterotóxigenica

ExPEC: *E. coli* causadora de doenças extraintestinais

LEE: *Locus of enterocyte effacing*

MEM: Meio Essencial Mínimo de Earle

PBS: Phosphate Buffered Saline

RU: Retocolite Ulcerativa

SFB: Soro fetal bovino

STEC: *E. coli* produtora da toxina de Shiga



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1. A doença de Crohn .....	12
2. A Microbiota Intestinal.....	14
3. A <i>Escherichia coli</i> .....	15
a. A <i>Escherichia coli</i> na doença de Crohn .....	17
4. Estrutura desta dissertação .....	20
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
1. Objetivo geral .....	22
a. Objetivos específicos .....	22
<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
1. Pacientes .....	24
2. Cultivo bacteriano .....	24
3. Teste de interação celular .....	24
a. Cultivo e manutenção de células epiteliais e macrófagos .....	24
b. Teste de adesão celular.....	25
c. Teste de invasão celular .....	26
d. Teste de replicação intracelular em macrófagos.....	27
e. Teste de citotoxicidade .....	27
f. Microscopia eletrônica de transmissão .....	28
4. Concentração inibitória mínima .....	29
5. Teste de formação de biofilme .....	29
6. Caracterização genética .....	30
a. Pesquisa de genes de virulência típicos de <i>E. coli</i> diarreiogênicas .....	30
b. Classificação em filogrupos da coleção de referência EcoR.....	30
7. Sequenciamento de DNA genômico.....	31
a. Sequenciamento em plataforma Ion Torrent .....	31
b. Análise de dados .....	31
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
1. Capítulo 1 – Caracterização das cepas da coleção .....	34
a. Interação com células epiteliais .....	34

b. Classificação por filogrupo EcoR.....	34
c. Formação de biofilme.....	34
2. Capítulo 2 – Caracterização fenotípica e genética da cepa D92/09 .....	38
3. Capítulo 3 – <i>Draft</i> e anotação do genoma da cepa D92/09 .....	49
a. <i>Draft</i> do genoma da cepa D92/09 .....	49
b. Anotação do genoma da cepa D92/09.....	52
<b>BREVE DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>

# **INTRODUÇÃO**

---

---

## 1. A DOENÇA DE CROHN

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) refere-se a um grupo de doenças que causam inflamações crônicas no trato gastrointestinal e não apresentam uma causa definida. Ela se apresenta sob duas formas clínicas: a Retocolite Ulcerativa (RU) e a Doença de Crohn (DC).

Na RU, a resposta inflamatória se restringe a região do cólon e reto. A inflamação é difusa, com grau variável de extensão, e é limitada à mucosa, resultando no aparecimento de edemas, ulcerações e hemorragias. Histologicamente, é encontrada inflamação aguda e crônica da mucosa com a presença de leucócitos polimorfonucleares e monócitos, abscessos das criptas e distorção das glândulas da mucosa. A principal manifestação clínica da RU é a presença de sangue e muco nas fezes, muitas vezes acompanhada por dor abdominal. A ocorrência de diarreia sanguinolenta é importante para diferenciar a UC da síndrome do intestino irritável. Além disso, a presença do sangue é um alerta importante que leva a um rápido diagnóstico da doença. A localização e intensidade da dor vão depender do grau de envolvimento do colón. (Hendrickson *et al.*, 2002) (Carter *et al.*, 2004).

Já na DC a inflamação pode ser transmural, podendo-se estender até a serosa, evoluindo para a formação de fístulas. Os achados histológicos incluem pequenas ulcerações superficiais sobre as placas de Peyer e inflamação crônica focal que se estende até a submucosa, geralmente acompanhada da formação de granulomas (Hendrickson *et al.*, 2002). Os sintomas da DC são mais sutis e inespecíficos, o que pode levar a um diagnóstico tardio. Eles vão depender do local, gravidade e extensão da resposta inflamatória, mas geralmente incluem dor abdominal, diarreia e perda de peso. Eventualmente os sintomas da DC podem ser confundidos com a RU, visto que pode incluir diarreia com sangue e muco tanto na RU quanto na DC. A DC pode acometer qualquer parte do trato gastrointestinal, sendo a região ileocecal a mais afetada (Hendrickson *et al.*, 2002).

Além dos sintomas intestinais, tanto a RU quanto a DC podem apresentar manifestações extraintestinais que incluem febre, artrite, lesões mucocutâneas, complicações oftalmológicas, doença hepatobiliares, doença renal e anomalias ósseas (Hendrickson *et al.*, 2002).

No Brasil, apesar da carência de dados da incidência da doença inflamatória intestinal, foi possível observar um aumento no número de mortes causado por ela nos últimos quinze anos (Datusus, 2015).

A etiologia da DII é desconhecida, mas sabe-se que há o envolvimento de diversos fatores ambientais e genéticos (Hendrickson *et al.*, 2002), que interagem entre si levando a resposta inflamatória exagerada (Fiocchi, 2015).

A suspeita do envolvimento genético com a DII surgiu a partir da observação de uma maior predisposição genética de parentes portadores da DII (Fiocchi, 2015) e também relatos de anormalidades imunológicas em parentes de primeiro grau de portadores de DII (Fiocchi, 1998). A partir de então, diversos estudos foram feitos buscando compreender melhor o envolvimento destes fatores com a etiologia da doença. Atualmente há a associação de 163 alterações genéticas com o desenvolvimento da DII, 30 delas relacionadas especificamente com o desenvolvimento da DC (Fiocchi, 2015). Na maioria dos casos, estas alterações implicam em uma resposta imunológica exagerada, que pode contribuir para o aparecimento da inflamação (Schirbel e Fiocchi, 2010). Apesar das diversas associações genéticas com o desenvolvimento da DC, o gene que se tem mais clareza em relação ao seu envolvimento com a DC é o gene NOD2/CARD15 (Scaldaferri e Fiocchi, 2007). NOD2 é uma proteína citosólica que reconhece componentes da parede celular bacteriana como peptidoglicano e lipopolissacarídeo (LPS). Ele é expresso em monócitos e induz a ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), responsável pela mediação na ativação de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-12 (IL-12) (Ardizzone e Bianchi Porro, 2002) (Ogura *et al.*, 2001). Alterações genéticas no gene NOD2 / CARD15, pode levar a uma alteração da proteína NOD2, afetando a sua capacidade de reconhecimento bacteriano e, conseqüentemente, alterando a ativação do NF- $\kappa$ B, causando uma resposta exagerada do sistema imunológico (Scaldaferri e Fiocchi, 2007). A grande quantidade de possíveis genes associados com a etiologia da DC comprova que esta doença não pode ser causada apenas por uma alteração gênica, mas sim pela interação entre os genes de risco e ainda pela combinação de fatores genéticos com fatores ambientais. (Fiocchi, 2015).

Os fatores ambientais são componentes essenciais da patogênese da DII. Um grande número destes fatores pode modificar a expressão de genes em indivíduos suscetíveis, provocando uma resposta imune exagerada no intestino. Diversas evidências epidemiológicas, clínicas e experimentais apoiam uma associação entre a DII e um grande número de fatores ambientais que incluem tabagismo, dieta, uso de contraceptivos orais e de anti-inflamatórios não esteroides (AINE), microbiota intestinal, permeabilidade intestinal e apendicectomia (Danese *et al.*, 2004; Schirbel e Fiocchi, 2010). Porém, o tabagismo e a microbiota intestinal

são os únicos que apresentam atualmente evidências mais sólidas do seu envolvimento com a patologia da DC (Danese *et al.*, 2004). O tabagismo é um fator que aumenta o risco do desenvolvimento da DC e piora o seu curso clínico. O mecanismo por trás deste efeito ainda é desconhecido, mas sabe-se que afeta o sistema imunológico e altera a permeabilidade da mucosa intestinal e a produção de muco, podendo contribuir assim para o desenvolvimento da DC. (Hendrickson *et al.*, 2002; Danese *et al.*, 2004; Schirbel e Fiocchi, 2010). A presença de bactérias é indispensável para o desenvolvimento inflamação do intestino na grande maioria dos modelos animais de DII, mostrando assim a importância deste fator para o desenvolvimento da inflamação (Danese *et al.*, 2004). Por muito tempo procurou-se identificar um agente infeccioso específico que pudesse estar envolvido diretamente com a etiologia da DC. Porém, nos últimos anos, diversos estudos mostraram que as próprias bactérias comensais da microbiota intestinal são por si só um fator importante do desenvolvimento da DII (Hendrickson *et al.*, 2002; Danese *et al.*, 2004; Chassaing e Darfeuille-Michaud, 2013).

## 2. MICROBIOTA INTESTINAL

O trato gastrointestinal contém cerca de  $10^{14}$  bactérias, as quais compreendem mais de 500 espécies diferentes, que juntas compõem a microbiota intestinal. Estas bactérias interagem diretamente com a mucosa intestinal, e esta interação é ao mesmo tempo essencial para metabolizar nutrientes, bem como para a maturação e desenvolvimento do sistema imunológico no intestino. Este mutualismo metabólico entre bactérias comensais e mucosa intestinal, quando alterado, pode levar ao desenvolvimento de resposta imunológica exagerada, causando inflamações exageradas, que podem evoluir para diversas doenças, entre elas a DC (Chassaing e Darfeuille-Michaud, 2013; Leone *et al.*, 2013).

Diversos fatores como a idade, drogas, e composição da dieta podem interferir diretamente na composição da microbiota intestinal e consequente homeostase do intestino (Yu e Huang, 2013). Vários estudos observaram que pessoas com uma microbiota menos diversificada são mais propensas a desenvolver DII (Fiocchi, 2015). Além disso, evidências epidemiológicas mostram que o uso frequente de antibióticos aumenta o risco de desenvolvimento da DC. Não se sabe se esta alteração na diversidade microbiana é uma causa primária ou uma consequência da inflamação crônica (Fiocchi, 2015), mas o seu papel no desenvolvimento da DC é indiscutível.

Análises da diversidade bacteriana em pacientes portadores da DC mostram que estes pacientes tem uma composição alterada da microbiota intestinal, apresentando uma menor diversidade nas espécies de bactérias comensais associadas à mucosa, mas quantidades elevadas destas bactérias. (Chassaing e Darfeuille-Michaud, 2013). Os pacientes com DII, em comparação com controles saudáveis, têm menos bactérias com propriedades anti-inflamatórias e/ou mais bactérias com propriedades pró-inflamatórias. Diversos estudos mostram que em pacientes portadores da DC há redução de bactérias pertencentes aos filos Bacteroidetes e Firmicutes, com uma diminuição no número de *Bacteroides fragilis*, uma bactéria simbiote normal da microbiota intestinal humana que, em modelo animal, apresenta um efeito protetor contra o desenvolvimento da colite, e *Faecalibacterium prausnitzii*, que pode regular a expressão de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, foi observado também aumento relativo no número de Proteobactéria, em particular, de bactérias pertencente à Família Enterobacteriaceae (Chassaing e Darfeuille-Michaud, 2013; Yu e Huang, 2013).

### 3. A *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à microbiota intestinal comum de mamíferos e animais de sangue quente. Ela normalmente coloniza o trato gastrointestinal de humanos logo após o seu nascimento (Kaper *et al.*, 2004) (Donnenberg, 2013). É um micro-organismo extremamente bem sucedido neste local, sendo o anaeróbio facultativo mais abundante na microbiota intestinal (Kaper *et al.*, 2004). A maioria de suas cepas não é patogênica e apresenta uma relação simbiótica com seu hospedeiro, contribuindo, inclusive, para a resistência contra organismos patogênicos. Porém, a *E. coli* também pode ser um patógeno capaz de causar diversos tipos de doenças não apenas no trato gastrointestinal, mas também nos rins e inflamações das meninges (Kaper *et al.*, 2004) (Donnenberg, 2013). Isto acontece pois existe diversas cepas de *E. coli* que adquiriram fatores de virulência e a capacidade de colonizar outras partes do organismo além do trato gastrointestinal (Donnenberg, 2013). Em geral, esses fatores de virulência são codificados por elementos genéticos que podem ser trocados entre cepas, criando combinações de fatores de virulência, ou elementos genéticos que foram incorporados ao genoma das cepas (Croxen e Finlay, 2010), (Donnenberg, 2013). De acordo com a presença de um ou mais fatores de virulência, foi possível a caracterização de alguns patótipos clássicos de *E. coli*. Para melhor estudo e classificação destes patótipos, as *E. coli* patogênicas foram divididas em dois grupos: as *E. coli* diarréogênicas (DEC), que causam doenças gastrointestinais (disenterias e diarreias), e as *E.*

*coli* que causam infecções extra-intestinais (ExPEC) (Kaper *et al.*, 2004) (Croxen e Finlay, 2010).

Dentro do grupo das *E. coli* diarreio-genicas, foram descritos seis patótipos clássicos. A *E. coli* enteropatogênica (EPEC) foi o primeiro patótipo de *E. coli* descrito em associação com infecções intestinais, é uma importante causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento (Kaper *et al.*, 2004). As EPECs tem a capacidade de aderir intimamente às células epiteliais do intestino, destruindo as microvilosidades da célula intestinal causando lesões conhecidas como *attaching and effacing* (A/E). A capacidade de causar estas lesões características é dada por genes presentes em uma ilha de patogenicidade denominada de *Locus of enterocyte effacing* (LEE) (Kaper *et al.*, 2004) (Donnenberg, 2013) (Croxen e Finlay, 2010). Sequencias homólogas ao LEE também são encontradas em outras cepas patogênicas que também causam lesões do tipo A/E, como por exemplo a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Donnenberg, 2013) (Croxen e Finlay, 2010) (Kaper *et al.*, 2004). A EHEC é um subgrupo de um patótipo de *E. coli*, a *E. coli* produtora da citotoxina de Shiga (STEC) (Donnenberg, 2013). A toxina de Shiga, Stx, é uma toxina que foi primeiramente identificada em *Shigella dysenteriae* e tem um forte efeito citotóxico (Kaper *et al.*, 2004) (Donnenberg, 2013). Existem dois subgrupos de Stx, Stx1 e Stx2. A STEC é capaz de colonizar o cólon intestinal, onde produz a toxina Stx, que pode causar dano local na mucosa intestinal, provocando diarreia sanguinolenta ou colite hemorrágica, e pode ainda entrar na corrente sanguínea e chegar aos rins, danificando as células epiteliais renais, provocando inflamação renal que pode evoluir para Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU) (Kaper *et al.*, 2004). O patótipo STEC inclui uma grande diversidade de cepas, com diversas combinações de fatores de virulência, e dentro deste patótipo está presente o grupo das EHECs (Donnenberg, 2013). A EHEC é conhecida por causar diversos tipos de doenças, desde diarreia sanguinolenta até a síndrome hemolítica urêmica (SHU) (Kaper *et al.*, 2004). O principal sorogrupo pertencente à EHEC é o sorogrupo O157:H7, que é encontrado principalmente em países da América do norte, Japão e partes da Europa (Croxen e Finlay, 2010). Além do gene que codifica Stx (*stx*), a EHEC apresenta também a ilha de patogenicidade LEE, que codifica diversos genes, entre eles o gene *eae*, que codifica a proteína íntima e dá à bactéria a capacidade de aderir ao epitélio intestinal e provocar lesões do tipo A/E (Donnenberg, 2013) (Kaper *et al.*, 2004).

Assim como as EHECs, um terceiro patótipo com capacidade de aderir ao epitélio intestinal e secretar toxinas é o patótipo da *E. coli* enterotóxigenica (ETEC). A ETEC causa diarreia aquosa e é uma importante causa de diarreia infantil nos países em desenvolvimento e



a principal causa de diarreia em pessoas que viajam para esses países (diarreia de viajantes) (Kaper *et al.*, 2004). A ETEC coloniza a mucosa intestinal, aderindo ao epitélio do intestino, e secreta enterotoxinas de dois tipos: as enterotoxinas termolábeis e as enterotoxinas termoestáveis (Kaper *et al.*, 2004) (Donnenberg, 2013). Um quarto patótipo de *E. coli* que é um importante causador de diarreia em adultos e crianças, é a *E. coli* enteroagregativa (EAEC). A EAEC é definida como *E. coli* que não produz enterotoxinas termolábeis e/ou termoestáveis, mas é capaz de aderir umas às outras e às células epiteliais formando um agregado em um padrão como se fossem tijolos empilhados (Kaper *et al.*, 2004). A EAEC secreta algumas enterotoxinas e citotoxinas e carrega em seu genoma o gene *aggR*, que é um ativador de transcrição de diversos fatores de virulência (Kaper *et al.*, 2004) (Donnenberg, 2013), entre eles fatores que dão à bactéria a capacidade de adesão e formação de agregados bacterianos (Donnenberg, 2013). Esses agregados bacterianos podem levar ainda a formação de biofilme na mucosa intestinal (Croxen e Finlay, 2010) (Donnenberg, 2013). Além da EAEC, é conhecido também a *E. coli* de adesão difusa (DAEC) que, ao contrário da EAEC, é capaz de aderir à células epiteliais apresentando padrão de aderência difuso mediado por adesinas (Kaper *et al.*, 2004).

É conhecido ainda um sexto patótipo de *E. coli*, a *E. coli* enteroinvasora (EIEC), que é uma *E. coli* que tem relação muito próxima à *Shigella spp*, tanto bioquimicamente como geneticamente. Taxonomicamente, a EIEC e a *Shigella* são indistinguíveis, e a patogênese de ambas inclui a capacidade de: invadir as células epiteliais da mucosa intestinal, se multiplicar dentro destas células e infectar as células vizinhas, além de induzir a apoptose em macrófagos. A infecção causada por estas bactérias pode levar a uma resposta inflamatória que se manifesta como uma ulceração intestinal (Kaper *et al.*, 2004).

#### **a. A *Escherichia coli* NA DOENÇA DE CROHN**

Por estar relacionada com diversos tipos de doenças intestinais e estar presente na microbiota intestinal, a *E. coli* tem sido bastante estudada quanto a uma possível associação com a DII. A suspeita do seu envolvimento com a etiologia da doença tem sido destacada a partir da observação do aumento do número destas bactérias é aumentado em pacientes com a DII (Seksik *et al.*, 2003; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Kotlowski *et al.*, 2007). Além disso, quando comparados com indivíduos controles, pacientes portadores da DII apresentam títulos maiores e também uma maior diversidade de anticorpos contra antígenos O de *E. coli*. (Jaskowski *et al.*, 2006). Portadores da DC apresentam não só uma prevalência maior em

cepas de *E.coli* em lesões do íleo, mas também maior prevalência de resposta humoral contra porina OmpC de *E. coli* do que indivíduos controles (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007). Porém, apesar de todas essas evidências, não se sabe ao certo qual o papel da *E. coli* na etiopatogenia da DC.

Muitos estudos têm sido feitos buscando entender os mecanismos de patogenicidade da *E. coli* que podem estar envolvidos com o desenvolvimento da doença. Sabe-se que *E. coli* isoladas a partir de pacientes com DC geralmente apresentam fatores de virulência de ExPEC, enquanto fatores de virulência típicos de *E. coli* diarreio gênicas raramente são encontradas nessas amostras (Thomazini *et al.*, 2011). Na análise filogenética, quando comparado com cepas da coleção de referência de *E. coli* (EcoR), observou-se que as *E. coli* isoladas de pacientes com DC são em sua maioria pertencente ao grupo B2 e D, grupos geralmente relacionados a ExPEC. (Kotlowski *et al.*, 2007). Além disso, foi observada uma relação direta entre o aumento da proporção de bactérias pertencentes aos grupos B2+D e a gravidade da doença (Martinez-Medina e Garcia-Gil, 2014).

Uma característica comumente encontrada em cepas isoladas de pacientes com DC é a capacidade de interagir com células epiteliais em testes *in vitro*, principalmente através da adesão e invasão celular (Seksik *et al.*, 2003; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Thomazini *et al.*, 2011). A capacidade de aderir e/ou invadir as células de epitélio intestinal é uma característica que não apenas auxilia a bactéria a colonizar a mucosa intestinal, mas também é muito importante para induzir a inflamação (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). A adesão bacteriana é o primeiro passo na patogenicidade de muitos organismos envolvidos em doenças infecciosas do intestino. Em estudo sobre as propriedades de interação celular de *E. coli* em pacientes com DC, Arlette Darfeuille-Michaud e colaboradores observaram que 80% das amostras isoladas a partir do íleo destes pacientes apresentam propriedades de adesão contra 33% nos pacientes controles. Além disso, foi notada também uma relação entre a adesão bacteriana às células intestinais e a colonização intestinal (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998).

Apesar do potencial de invasibilidade observado nestas cepas serem semelhantes à patótipos invasivos clássicos, o mecanismo de invasibilidade encontrado em *E. coli* isoladas a partir de pacientes portadores da DC se mostrou diferente daquele encontrado na EIEC, apresentando então uma invasão dependente de filamentos de actina e microtúbulos (Boudeau *et al.*, 1999). Ainda, as *E. coli* invasoras encontradas em portadores de doença de Crohn são

capazes de invadir e se replicar no interior de macrófagos sem causar a sua morte celular, e induzir neles a produção de TNF- $\alpha$  (Glasser *et al.*, 2001; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2007). Essas propriedades levaram então a identificação de um novo patótipo de *E. coli*, conhecida como *Adherent-invasive E. coli* (AIEC), sendo caracterizada por: (1) capacidade de aderir células epiteliais intestinais, (2) capacidade de invadir células epiteliais intestinais *in vitro* através de mecanismo dependente de filamentos actina e microtúbulos, (3) invadir e se replicar no interior de macrófagos, e (4) induzir a secreção de TNF- $\alpha$  em macrófagos infectados (Glasser *et al.*, 2001; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Martinez-Medina e Garcia-Gil, 2014). AIEC tem sido encontrada frequentemente em lesões do íleo em pacientes portadores da DC, indicando seu possível envolvimento com a doença. (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). Assim sendo, muitos estudos têm sido feitos buscando entender e relacionar os mecanismos de patogenicidade da AIEC com o desenvolvimento da DC.

Em pacientes portadores da DC foi observado que a adesão de AIEC em células epiteliais intestinais é dependente de uma variante de pili 1 expressa na membrana bacteriana e da molécula 6 do antígeno carcinoembriogênico relacionado com adesão celular (CAECAM6) presente na membrana de células epiteliais intestinal. CAECAM6 atua como receptor para a adesão de AIEC e em pacientes com DC tem geralmente sua expressão aumentada. Estudos *in vitro* mostram que há um aumento da expressão CEACAM6 em células epiteliais intestinais após a estimulação por IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  e após a infecção por AIEC, indicando que AIEC podem promover a sua própria colonização em pacientes com DC (Barnich *et al.*, 2007). Acredita-se que a ligação com CAECAM6 dê sequência a invasão a células epiteliais e consequente translocação do epitélio intestinal para tecidos mais profundos onde poderão ativar células do sistema imunológico, como os macrófagos (Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007).

É bem estabelecido o potencial que a AIEC tem de invadir e se replicar em macrófagos. Esta replicação intracelular causa um aumento na produção de TNF- $\alpha$  que estimula a liberação de interleucina-8 (IL-8) pelos enterócitos e o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares para a superfície da mucosa, contribuindo para o processo inflamatório (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). Esta ativação contínua de macrófagos, e a liberação de TNF- $\alpha$  pode provocar a formação de granulomas, que é uma característica histológica da DC. (Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007; Meconi *et al.*, 2007; Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007).

Assim, AIEC seria capaz de atuar sobre a DC através dos seguintes mecanismos: (1) expressão anormal de CEACAM6 na mucosa do íleo de pacientes portadores da CD, induzindo a (2) colonização da AIEC, (3) adesão e (4) invasão a células epiteliais, que permitem que as bactérias possam atravessar a mucosa intestinal. Após ultrapassar a mucosa, a AIEC pode (5) sobreviver e se replicar dentro macrófagos infectados na lâmina, (6) induzir a secreção de TNF- $\alpha$ , levando a (7) formação de granulomas (Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007). Além disto, acredita-se que a infecção pela AIEC esteja diretamente ligada à predisposição genética, uma vez que a super-expressão do gene da proteína CEACAM6 na mucosa do íleo favorece a colonização da AIEC (Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007), e ainda mutações do gene NOD2 prejudicam a defesa contra bactérias intracelulares em células epiteliais e podem ainda provocar inflamação através de uma resposta imune exagerada mediada por células T-helper, Th1 (Watanabe *et al.*, 2004).

Como um dos principais agentes bacterianos supostamente vinculados à causa da doença de Crohn, as AIEC têm sido usadas como referência na caracterização de *E. coli* isoladas de portadores da doença (Martinez-Medina e Garcia-Gil, 2014).

#### **4. ESTRUTURA DESTA DISSERTAÇÃO**

Este trabalho é aqui apresentado em sete partes incluindo além desta Introdução, dos Objetivos e a Metodologia, 3 capítulos de resultados, com uma breve discussão e conclusão, e as referências bibliográficas.

# **OBJETIVOS**

## 1. OBJETIVO GERAL

Promover a caracterização fenotípica e genética de uma coleção de isolados de *E. coli* encontradas em diferentes materiais clínicos de pacientes portadores de doença de Crohn.

### a. Objetivos específicos

- i. Avaliar a capacidade interação celular (adesão e invasão e citotoxicidade) bacteriana das amostras isoladas em pelo menos uma linhagem de célula epitelial e formação de biofilme, tendo como referência a amostra de AIEC LF82 e outros controles.
- ii. Pesquisa de genes de virulência que definem categorias diarreio gênicas de *E. coli*
- iii. Classificação em filogrupos da coleção de referência EcoR de *E. coli*,
- iv. Sequenciamento genômico de uma amostra da coleção bacteriana analisada.

# **METODOLOGIA**

## 1. PACIENTES

O grupo de pacientes estudados compreende indivíduos atendidos no Hospital das Clínicas de Botucatu para exame rotineiro de endoscopia. No total, foram analisados 14 pacientes, sendo 9 pacientes portadores da Doença de Crohn e 5 pacientes controles, de ambos os sexos, com idade entre 15 e 75 anos. De cada paciente, foram submetidas ao cultivo bacteriano amostras de fezes e de 1 a 3 biópsias da mucosa de diferentes partes do intestino.

## 2. CULTIVO BACTERIANO

As amostras bacterianas foram isoladas a partir de culturas de material clínico em placas de ágar MacConkey (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), obtidas por semeadura direta, por esgotamento. De cada cultura, foram selecionadas 10 colônias fermentadoras de lactose (Lac+) e eventualmente algumas não fermentadoras de lactose (Lac-). Estas colônias foram transferidas para os meios de EPM, MiLi e Citrato de Simmons (Detoledo *et al.*, 1982), para a realização dos seguintes testes bioquímicos: produção de urease, desaminação de L-triptofano, produção de H<sub>2</sub>S, fermentação de glicose, formação de gás a partir da fermentação de glicose, utilização de citrato de sódio como fonte única de carbono, movimentação bacteriana, descarboxilação de lisina e produção de indol. As colônias que apresentaram resultados positivos para produção de indol e fermentação de glicose, e resultados negativos para produção de H<sub>2</sub>S e urease e para desaminação de L-triptofano foram consideradas como *E. coli*. Estas amostras foram então cultivadas em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) durante a noite e posteriormente misturadas com 15% de glicerol para armazenamento em freezer a -80°C até utilização em testes.

## 3. TESTE DE INTERAÇÃO CELULAR

### a. Cultivo e manutenção de células epiteliais e macrófagos

Para os testes de interação celular foram utilizadas células epiteliais HEp-2, Caco-2 e Vevo (Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, Brasil) e também macrófagos do tipo murino da linhagem J774.

Para obtenção de monocamada celular, células HEp-2 foram cultivadas em garrafas de poliestireno de área de 25 cm<sup>2</sup>, em Meio Essencial Mínimo de Earle (MEM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), adicionado 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), penicilina, estreptomicina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) e



anfotericina B (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, submetidas a repiques sucessivos realizados a cada três dias.

As células Caco-2 e células Vero foram cultivadas utilizando o meio de cultura Earle 199 (Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, Brasil) com adicional de 15% de SFB, penicilina, estreptomicina e anfotericina B. As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub>, para as células Caco-2, e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para as células Vero. Ambas foram submetidas a repiques sucessivos realizados a cada cinco dias.

Para o cultivo de macrófagos, foi utilizado meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, EUA) com 10% de SFB, penicilina, estreptomicina e anfotericina B. As condições de cultivo foram as mesmas das células HEp-2.

#### **b. Teste de adesão celular**

Para a realização do teste de adesão, após a tripsinização da cultura celular, as células HEp-2 tiveram volumes ajustados para  $1 \times 10^5$  células/ml e volumes entre 0,7 e 1,0 ml de suspensão foram transferidas para poços em microplacas, contendo 24 poços por placa, contendo lamínulas esféricas e incubadas por aproximadamente 24 horas em estufa a 37°C e CO<sub>2</sub> até atingirem o estado de semiconfluência.

Após a incubação o meio de cultura foi desprezado dos poços e as células foram lavadas de 3 a 4 vezes com *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Volumes entre 0,7 e 1,0 ml de meio MEM/SFB com 1% de D-manose (Sigma, St Louis, MO, EUA) foram acrescentados e em seguida, 20 µl de cultura bacteriana, de crescimento de 18 horas em meio BHI, foram inoculados em cada poço. As preparações foram incubadas por 3 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o meio de cultura foi desprezado e a monocamada celular foi lavada de 4 a 5 vezes com PBS e fixadas com metanol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) por um período mínimo de 30 minutos. Em seguida a preparação foi corada por 10 minutos com May-Grünwald (Sigma, St Louis, MO, EUA) e 15 minutos com Giemsa (Newprov, Paraná, Brasil). Os poços foram lavados em água corrente e as lamínulas foram retiradas. Depois de secas as lamínulas foram montadas em lâminas e observadas ao microscópio. Foram consideradas aderentes aquelas amostras em que em um campo de observação de 200 células HEp-2 apresentavam pelo menos uma célula bacteriana.

### c. Teste de invasão celular

Para a realização do teste de invasão, as células HEp-2 foram tripsinizadas e transferidas para poços de cultura em microplacas (Kasvi, Curitiba, Brasil), na quantidade de  $8 \times 10^5$  células por poço, em placas com 12 poços cada, e incubadas por 20 horas em estufa a 37° e 5% de CO<sub>2</sub>.

As amostras bacterianas a serem testadas foram cultivadas em meio BHI *overnight* e as culturas bacterianas foram ajustadas ao padrão de turbidez 0,5 da Escala de McFarland.

Os poços contendo a monocamada celular foram inicialmente lavados três vezes com PBS após descarte do meio de cultura. Em seguida, foram adicionadas amostras bacterianas, numa proporção de 10 bactérias por célula HEp-2, em cada poço juntamente com meio de cultura MEM/SFB sem antibiótico e a placa foi incubada por três horas em estufa a 37° e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período de infecção, foi desprezado o meio de cultura, realizada novamente a lavagem três vezes com PBS e adicionado a cada poço 2 ml de meio MEM/SFB acrescido de 100µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). A placa foi incubada por uma hora nas mesmas condições anteriores e em seguida foi realizada novamente a lavagem com PBS por três vezes. Posteriormente a isso as células foram submetidas à lise, com solução de Triton-X 100 (Sigma, St Louis, MO, EUA) a 1% em água destilada estéril. O lisado foi então submetido à diluição seriada e plaqueado em Ágar Nutriente (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para quantificar as bactérias intracelulares. Os testes foram realizados em triplicata, utilizando sempre como controle positivo, a *E. coli* enteroinvasora (EIEC), e uma de controle negativo, *E. coli* K12 HB101. A porcentagem de invasibilidade foi dada pela razão do número de bactérias encontradas no lisado pelo número de bactérias inoculadas. Foram consideradas invasoras as amostras que apresentaram pelo menos 50% da invasão encontrada no controle positivo, EIEC.

Foi realizado também teste de invasão celular utilizando células Caco-2 do mesmo modo, salvo tempo de incubação da monocamada celular antes do teste que neste caso foi de 48 horas, e meio de cultura e porcentagem de CO<sub>2</sub> na estufa que neste teste foram os mesmos utilizados no cultivo das células Caco-2. Os testes foram realizados em triplicata, utilizando como controle positivo, a *E. coli adherent and invasive* (AIEC), e controle negativo, *E. coli* K12 HB101.

#### **d. Teste de replicação intracelular em macrófagos**

Para avaliar a capacidade das amostras se replicarem em macrófagos, foi realizado o teste de replicação em macrófagos utilizando macrófagos do tipo murino de linhagem J774. Os macrófagos foram inoculados em placa de Petri de 35 mm na concentração de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 18 horas.

Após a incubação, o meio foi removido e a monocamada celular foi lavada com PBS por três vezes. Foi adicionado então meio RPMI 1640 com 10% de SFB e sem antibióticos e em seguida as células foram infectadas com as amostras a serem testadas, numa proporção de 10 bactérias por célula. As placas foram então incubadas por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida foi descartado o meio de cultura, e a monocamada foi lavada com PBS por três vezes. Foi então adicionado meio RPMI 1640 com 10% de SFB e 100ug/ml de gentamicina, e as placas seguiram para incubação por 1 hora em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, uma parte das placas foram submetidas à lise celular, com solução de Triton X-100 a 1% em água destilada e incubadas em temperatura ambiente durante 5 minutos, e a solução do lisado celular foi semeada em placas de ágar nutriente e incubadas por uma noite em estufa a 37°C, para avaliar a capacidade de invasão em macrófagos da amostra em questão.

As placas que não foram submetidas à lise celular, após o meio de cultura ser descartado, foi feita a lavagem da monocamada celular com PBS por três vezes, adicionado meio RPMI 1640 com 10% de SFB e 20ug/ml de gentamicina à monocamada celular e em seguida as placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as placas foram submetidas à lise celular, como descrito anteriormente, e a solução do lisado foi semeada em placas de ágar nutriente e incubadas por uma noite em estufa a 37°C. Após esse tempo foi feita a contagem do número de bactérias intracelular e este número foi comparado ao encontrado após o tratamento com gentamicina por 1 hora. Assim foi possível observar o quanto as amostras invasoras foram capazes de se multiplicar dentro dos macrófagos no período de 24 horas.

#### **e. Teste de citotoxicidade**

A capacidade de provocar a morte celular (citotoxicidade) foi avaliada em células Vero, pelo tratamento de monocamadas destas células com sobrenadantes e lisados da cultura

bacteriana. Juntamente com a amostra, foram utilizadas no teste as cepas de *E. coli* K12-HB101 e AIEC LF82 como controle negativos e EHEC EDL933 como controle positivo.

As bactérias foram cultivadas em 10 ml de meio Penassay *overnight*, a 37°C em estufa bacteriológica. Após esse período, os 10 ml da cultura foram transferidos para um Erlenmeyer contendo 25 ml de meio Penassay e incubados em shaker a 37°C e 150 RPM de agitação por 18 horas. Posteriormente, o subcultivo foi centrifugado a 8.000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e filtrado em membrana de 0,22 µm para obtenção do Filtrado 1 (Sobrenadante da cultura).

Após a retirada do sobrenadante, o pellet foi então lavado duas vezes com PBS, e ressuspenso em solução de sulfato de polimixina B (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) em PBS na concentração de 1 mg/ml. A suspensão foi então incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 30 minutos. Posteriormente a suspensão foi centrifugada a 8.000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e filtrado em membrana de 0,22 µm para obtenção do Filtrado 2 (Lisado da cultura). Os filtrados foram armazenados a -20°C até sua utilização.

Para a realização do teste, foi preparada uma cultura de células Vero em placas de 96 poços, onde foi colocado 150µl da cultura de célula na concentração de  $1 \times 10^5$  cél/ml em cada poço e em seguida a placa foi incubada por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após as 24 horas, as células foram lavadas três vezes com PBS e foi adicionado meio MEM sem antibiótico (112,5 µl) e o filtrado de interesse nas diluições já preparadas (37,5 µl). Para o teste, o filtrado foi diluído nas seguintes proporções: 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256.

Em seguida, as placas foram encubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e as culturas foram observadas após 24h, 48h e 72h. Após este período foi feita a contagem de células mortas e células vivas em casa poço, e calculado a razão entre elas.

#### **f. Microscopia eletrônica de transmissão**

Para observação em microscopia eletrônica de bactérias invasoras dentro das células HEp-2, foi feita a preparação da monocamada de células em uma garrafa de 75 cm<sup>2</sup> como no teste de invasão. A monocamada celular foi lavada três vezes com PBS e as amostras bacterianas foram inoculadas numa proporção de 10 bactérias por célula. A garrafa foi então incubada em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 5 horas. Após este período as células foram

lavadas três vezes com PBS e incubadas por 1 hora com meio MEM/SFB acrescido de 100ug/ml de gentamicina em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida a monocamada celular foi lavada com PBS e as células foram removidas da garrafa, centrifugadas a 4.000 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram então fixadas em solução de glutaraldeído de Karnovsky durante 12 horas. Após este período as células seguiram para processamento e cortes para observação em Microscópio Eletrônico de Transmissão em procedimentos de rotina no Centro de Microscopia Eletrônica – CME do IBB/Unesp.

#### **4. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA**

Para excluir a possibilidade de que a presença de bactérias nos lisados celulares dos testes de invasão fosse devido à resistência a gentamicina, as amostras invasoras foram submetidas ao teste de concentração inibitória mínima (MIC) de gentamicina, utilizando tiras MIC *avalicator* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) em ágar Müeller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) de acordo com instruções do fabricante.

#### **5. TESTE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME**

Para a pesquisa quanto a formação de biofilme, as amostras foram primeiramente cultivadas em meio LB a 37°C *overnight*. Posteriormente, em placas contendo 24 poços, foi adicionado 1 ml de meio LB em cada poço, e em seguida adicionado 50 µl da cultura por poço. A placa contendo o preparo foi então incubada a 37°C por 24 horas. Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com PBS e adicionado 1 ml de formalina a 2% em cada poço por pelo menos 20 minutos. Em seguida os poços foram lavados com água destilada e corados com cristal violeta a 1%.

Para a quantificação da formação de biofilme, foi adicionado em cada poço 1 ml de metanol seguido de incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. Após este período foi feita a medição da densidade óptica a OD<sub>620</sub> nm.

O teste foi realizado em triplicata, utilizando a amostra *E. coli* 042 como controle positivo. Foram consideradas formadoras de biofilme as amostras que apresentaram pelo menos 50% da densidade óptica observada no controle positivo, *E. coli* 042.

## 6. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

### a. Pesquisa de genes de virulência típicos de *E. coli* diarreio gênicas

As amostras que apresentaram invasão positiva em HEp-2 foram então submetidas a Multiplex PCR para a pesquisa dos genes de virulência *eae*, *stx*, *elt*, *aggR*, e *ipaH*, que são usados para identificação das categorias de *Escherichia coli* diarreio gênicas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* enteroinvasora (EIEC), respectivamente.

Para um volume final de 25µl, foi preparada uma mistura contendo: 5µl de Taq 5X Master Mix (BioLabs, New England, EUA), 0,25 µl da solução com o Mix de Primers contendo 0,125 µM de cada *primer* utilizado, 2 µl do DNA das amostras e 17,75 µl de água deionizada estéril. As misturas foram então levadas a um termociclador, utilizando o seguinte programa: 95°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto, por 30 ciclos, e 72°C por 10 minutos. O produto do PCR foi levado a eletroforese em gel de agarose (Sigma, St Louis, MO, EUA) a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e observado se houve amplificação dos genes pesquisados. Foram utilizadas como controle positivo as amostras de referências STEC, EPEC, ETEC, EAEC e EIEC.

### b. Classificação em filogrupos da coleção de referência EcoR

Sabendo que uma das características da espécie *E. coli* consiste no fato de apresentar uma ampla variedade genética e fenotípica, algo que reflete diretamente no potencial de patogenicidade da bactéria, Ochman e Selander analisaram uma coleção de isolados de *E. coli* de diferentes origens e fonte de isolamento, tendo dividido-as em grupos segundo o potencial de patogenicidade. Esta coleção, designada de EcoR, inclui 4 grandes filogrupos ou complexos clonais: A, B1, B2 e D (Ochman e Selander, 1984). Os dois primeiros concentram principalmente cepas comensais e os últimos, a maioria das cepas patogênicas. Cada um destes filogrupos pode ser detectados por um multiplex PCR, que detectam tanto genes possivelmente determinantes de virulência como sequências crípticas (Kotlowski *et al.*, 2007).

Para classificação de filogrupos da coleção de referência EcoR, foi realizado um multiplex PCR onde, para um volume final de 25µl, foi preparada uma mistura contendo: 6 µl de Taq 5X Master Mix, 1 µl da solução com o Mix de *Primers*, 2 µl do DNA das amostras e

16 µl de água deionizada estéril. As misturas foram então levadas a um termociclador, utilizando o seguinte programa: 94°C por 4 minutos, seguido se 30 ciclos das seguintes condições: 94° por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos, e finalizando com 72°C por 10 minutos. O produto do PCR foi levado à eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE e observado quais genes foram amplificados para classificação nos filogrupos de acordo com Kotlowski e colaboradores.

## 7. SEQUENCIAMENTO DE DNA GENÔMICO

### a. Sequenciamento em plataforma Ion Torrent

Para sequenciamento, o DNA extraído da amostra foi submetido à fragmentação enzimática através do Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, Guilford, CT), a partir de 100ng de DNA. Em seguida, foram selecionados os fragmentos de 400 pb em sistema de eletroforese E-gel size-select (Life Technologies, Guilford, CT). Os fragmentos foram então ligados Ion Sphere™ particles (ISP) para a amplificação clonal em PCR de emulsão no instrumento Ion OneTouch™ 2 System (Life Technologies, Guilford, CT) e feita a amplificação destes fragmentos. Posteriormente, as partículas ISP carregadas seguiram para o sequenciamento utilizando Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) System e um chip 314 (Life Technologies, Guilford, CT). Todo o processo foi feito seguindo instruções do manual do fabricante.

### b. Análise dados

O sequenciamento foi feito em duas cepas, obtidas de um mesmo paciente, sendo uma delas (D90/09) realizado apenas parcialmente e a outra (D92/09) de todo o genoma. O sequenciamento parcial gerou informação apenas suficiente para a identificação do MLST, de modo a investigar possível similaridade entre ambas. Nos dois os casos, diferentes arquivos (extensões \*.bam, \*.fasta e \*.fastq) com dados do DNA de cada cepa foram gerados no servidor do PGM. O arquivo \*.fastq foi submetido ao site do Centro de Epidemiologia Genômica da Universidade Técnica da Dinamarca (Larsen *et al.*, 2012), que forneceu o MLST e as sequências dos genes correspondentes. O arquivo na extensão \*.bam foi diretamente utilizado para depósito das sequências na base de dados do GenBank “Sequence Read Archive” (SRA), destinada a plataformas de última geração. Além da SRA, o genoma da cepa D92/09 foi depositado na base “Whole Genome Shotgun” (WGS), que armazena

sequências na forma de “*draft*”, isto é, ainda não completamente determinadas. Estas submissões foram feitas com base nas orientações apresentadas no portal da instituição.

O genoma da cepa D92/09 foi anotado, porém os dados de anotação não foram depositados. O processo de anotação teve início com o alinhamento de *contigs* (fragmentos das sequências contidas em um arquivo \*.fasta) no software Mauve (Darling *et al.*, 2010), tendo como referência a *E. coli* ST2747 (número de acesso CP007394.1), cepa depositada no GenBank com a qual o genoma em análise apresentava maior similaridade no alinhamento por Blast. Uma vez alinhados, os *contigs* foram unidos, formando uma sequência única, utilizando-se um comando do software Artemis (Rutherford *et al.*, 2000). O arquivo produzido no Artemis foi então submetido à anotação no Servidor RAST (Aziz *et al.*, 2008). As informações sobre as propriedades fenotípicas e funcionalidades da cepa foram analisadas e organizadas no Artemis (Rutherford *et al.*, 2000).



# **RESULTADOS**

---

---

Os resultados do trabalho são aqui apresentados em três capítulos, sendo o primeiro relativo à caracterização das cepas da coleção, o segundo referente às características fenotípicas da STEC D92/09 e o terceiro sobre a anotação de seu genoma. Os segundo capítulo corresponde ao trabalho publicado contendo os dados da caracterização bacteriana e o terceiro capítulo compreende uma pequena publicação sobre o *draft* do genoma, bem como a anotação do genoma.

## **1. CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DA COLEÇÃO**

### **a. Interação com células epiteliais**

Nos testes de adesão celular, onde foram estudadas uma média de  $4,6 \pm 3,4$  amostras bacterianas por paciente, 5 dos 9 pacientes portadores da DC (56%) e 4 dos 5 pacientes controles (80%) apresentaram amostras aderentes e expressando o padrão de adesão agregativo. A diferença entre casos e controles não mostrou ser estatisticamente significativa.

Nos testes de invasão celular, arbitrariamente consideramos invasoras as amostras que apresentaram pelo menos metade da invasibilidade da EIEC (invasão média = 0,2%). Com base neste critério, foram encontradas amostras invasoras em 4 dos 9 pacientes portadores da DC (44%), mas em nenhum dos pacientes controles ( $p = 0,006$ ). Todas as amostras consideradas invasoras foram submetidas ao teste de sensibilidade a gentamicina e tiveram seu crescimento inibido numa concentração da droga 10 vezes menor que a utilizada no teste, indicando que a contagem bacteriana por UFC correspondeu a bactérias intracelulares, não sendo, portanto, devido a uma possível resistência ao antimicrobiano.

### **b. Classificação por filogrupos EcoR**

Na classificação por filogrupos EcoR, foi observado dentro do grupo de pacientes controles que 3 dos 5 pacientes deste grupo apresentaram amostras pertencentes ao filogrupos B1 (60%). Já no grupo de pacientes portadores de DC, 7 dos 9 pacientes portadores apresentaram amostras pertencentes ao filogrupos B2 (78%), sendo este o filogrupos predominante neste grupo de pacientes ( $p = 0,002$ ). (Tabela 1).

### **c. Formação de biofilme**

Conforme detalhado na Metodologia, a detecção de biofilme se baseou na medida de densidade óptica de bactérias que resistiram à lavagem com PBS, permanecendo na superfície

de microplacas, posteriormente coradas e cuja suspensão teve a densidade óptica aferida a 620 nm (DO<sub>620</sub>). Arbitrariamente, consideramos formadoras de biofilme amostras cuja suspensão apresentou DO<sub>620</sub> pelo menos 50% da observada em suspensões EAEC 042 (DO<sub>620</sub> média = 0,241 ± 0,18). Tendo por base este critério, amostra formadora de biofilme foi encontrada apenas no paciente 6a (Tabela 1).

**Tabela 1 - Resultados teste de interação celular, formação de biofilme e classificação por filogrupo EcoR**

PACIENTE	DIAGNÓSTICO <sup>a</sup>	Nº AMOSTRAS	FILOGRUPO	ADESÃO <sup>b</sup>	INVASÃO (%) <sup>c</sup>	BIOFILME (%) <sup>d</sup>
<b>1</b>	DC	3	B2	AA	101,4 ± 11,3	26 ± 3,2
<b>2</b>	DC	4	B2	NA	3,0 ± 0,0	20 ± 7,0
<b>3</b>	DC	2	B2	NA	41,0 ± 4,4	19 ± 0,2
		2	D	NA	52,0 ± 1,3	19 ± 0,2
<b>4</b>	DC	6	B2	NA	78,1 ± 8,8	21 ± 7,2
<b>5</b>	DC	4	A	NA	0,1 ± 0,0	17 ± 1,6
		2	D	AA	51,6 ± 67,6	16 ± 0,2
<b>6 a</b>	DC	8	A	NA	8 ± 4,3	62 ± 48,7
		1	B2	AA	3,8 ± 0,0	18 ± 0,0
<b>6 b</b>	DC	11	B2	AA	1,1 ± 1,0	19,4 ± 9,6
		1	A	AA	1,4 ± 0,0	15 ± 0,0

Continua na próxima página

<sup>a</sup> DC: Doença de Crohn, CO: Paciente controle<sup>b</sup> Resultados do teste de adesão onde: AA: Adesão agregativa, NA: Não aderente<sup>c</sup> Resultado expresso pela razão da invasão média da amostra e a invasão média da EIEC.<sup>d</sup> Resultado expresso pela razão da medição da densidade óptica da amostra e a densidade óptica da cepa 042 a 620nm.

Tabela 1 - Continuação

PACIENTE	DIAGNÓSTICO <sup>a</sup>	Nº AMOSTRAS	FILOGRUPO	ADESÃO <sup>b</sup>	INVASÃO (%) <sup>c</sup>	BIOFILME (%) <sup>d</sup>
7	DC	3	B1	NA	4,0 ± 1,9	26 ± 16,0
		4	A	NA	18,9 ± 30,1	16 ± 0,8
		2	B2	NA	2,4 ± 2,9	17 ± 1,9
8	DC	4	A	AA	6,1 ± 0,5	15 ± 0,4
9	DC	4	A	AA	23,6 ± 3,3	24 ± 16,6
10	CO	1	A	AA	0,0 ± 0,0	14 ± 0,0
11	CO	1	B1	AA	0,0 ± 0,0	15 ± 0,0
12	CO	2	B1	NA	4,8 ± 2,1	15 ± 0,0
13	CO	3	B2	AA	0,0 ± 0,0	23 ± 12,5
14	CO	1	B1	AA	0,0 ± 0,0	16 ± 0,0

<sup>a</sup> DC: Doença de Crohn, CO: Paciente controle

<sup>b</sup> Resultados do teste de adesão onde: AA: Adesão agregativa, NA: Não aderente

<sup>c</sup> Resultado expresso pela razão da invasão média da amostra e a invasão média da EIEC.

<sup>d</sup> Resultado expresso pela razão da medição da densidade óptica da amostra e a densidade óptica da cepa 042 a 620nm.

**2. CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENÉTICA DA CEPA  
D92/09**



RESEARCH

Open Access

# *Escherichia coli* from Crohn's disease patient displays virulence features of enteroinvasive (EIEC), enterohemorrhagic (EHEC), and enteroaggregative (EAEC) pathotypes

Ana Carolina da Silva Santos<sup>1</sup>, Fernando Gomes Romeiro<sup>2</sup>, Ligia Yukie Sasaki<sup>2</sup> and Josias Rodrigues<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** *Escherichia coli* is a normal inhabitant of the gut which upon acquiring virulence factors becomes potentially able to cause diseases. Although *E. coli* population augments in Crohn's disease (CD), the reason of this proliferation is not yet clear. CD associated *E. coli* shows features of extraintestinal pathogenic categories (ExPEC), and eventually the ability to invade cultured epithelial cells, a property observed among diarrheagenic *E. coli* (DEC). In this work, data on the characterization of an *E. coli* isolate from a CD patient reveal that, besides invasiveness, CD associated *E. coli* may harbor other typical DEC markers, namely those defining enterohemorrhagic (EHEC) and enteroaggregative (EAEC) pathotypes.

**Results:** The studied strain, detected both in an ileum biopsy and stools, belonged to the B2 *E. coli* reference collection (EcoR) phylogroup and harbored the intimin, Shiga cytotoxin 1, and AggR transcriptional activator encoding genes (*eae*, *stx1*, *aggR*, respectively); displayed aggregative adherence to Hep-2 cells and an ability to enter Caco-2 cells four times as high as that of EIEC reference strain and half of invasiveness of AIEC LF82. It was able to enter and replicate in J774 macrophages with invasiveness 85 times as high as that of LF82, but with only one sixth of the intracellular proliferation ability of the later. Extracellular products with cytotoxic activity on Vero cells were detected in strain's cultures. Preliminary analysis indicated similarity of this strain's genome with that of O104:H4/2011C-3493.

**Methods:** Following its isolation from a resected CD patient, the strain was characterized by in vitro adhesion and invasion assays to Hep-2, invasion to Caco-2 cells and to J774 macrophages and tested for the ability to form biofilm and to produce Shiga cytotoxins. PCRs were carried out to identify virulence genetic markers and for EcoR phylogrouping. The strain's genome was sequenced by means of Ion torrent PGM platform.

**Conclusion:** The detection, in a CD patient, of an *E. coli* combining virulence features of multiple DEC pathotypes seems not only to stress the relevance of *E. coli* to CD etiopathogenesis but also to indicate the existence of new and potentially more virulent strains putatively associated with this disease.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Crohn's disease, Invasive, MLST, Serotype, Adherence, Virulence

\* Correspondence: josias@ibb.unesp.br

<sup>1</sup>Laboratory of Medical Bacteriology, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences of the State University of São Paulo (UNESP), Brazil, Distrito de Rubião Junior, CEP 18618-970 Botucatu, SP, Brazil  
Full list of author information is available at the end of the article

## Background

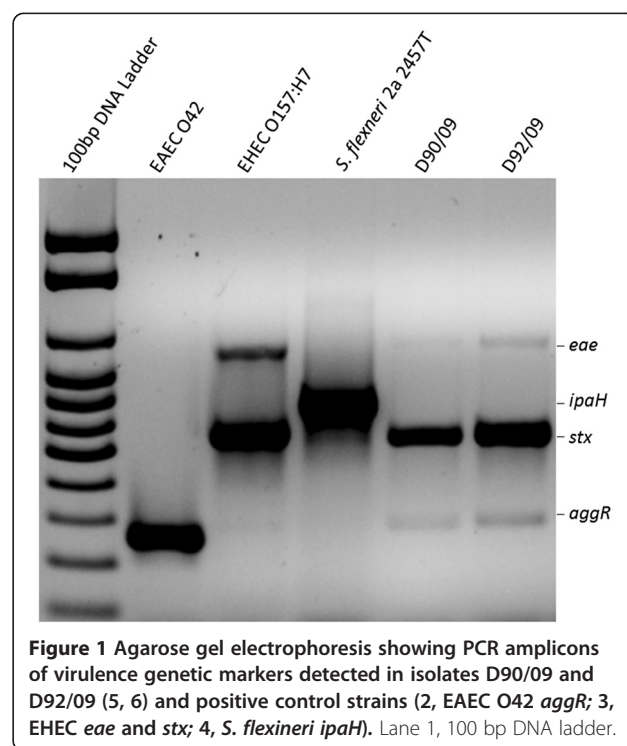
Crohn's disease (CD), one of the clinical variants of inflammatory bowel diseases (IBD), is characterized by chronic lesions of varying intensity along the gastrointestinal tract resulting from an exacerbated reaction of a defective immune system. The stimulus for the anomalous immune response is credited to the local resident microbiota which, in CD patients, presents with a reduced biodiversity along with the abundance of particular bacterial species such as *Escherichia coli*. The success of *E. coli* proliferation under this pathological condition has been explained by its capacity to metabolize nitrogen and sulfur by-products of inflammation, outcompeting anaerobes [1]. In addition, this elevation is particularly evident in the gut mucosa [2] where they are able to translocate M cells in Peyer patches and lymphoid follicles, which is the site of early lesions [3,4]. Differential characteristics of the augmented *E. coli* population include multi-drug resistance [5], association with B2 and D phylogroups [6] and the ability to interact with different kinds of epithelial cell lineages [7]. The later observation led to the description of adherent and invasive *E. coli* (AIEC), following extensive characterization studies on the LF82 strain [8]. In *in vitro* assays, AIEC is able to attach to and to invade non-intestinal and intestinal epithelial cells [7,9] and to survive inside macrophages [10]. In macrophages, the internalized bacteria not only keep the cell viability but also replicate and trigger the expression of TNF- $\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine. Although these cell interaction strategies resemble those employed by enteric pathogens such as *Salmonella* and classical enteroinvasive *E. coli* (EIEC), AIEC do not share their virulence background [9]. The ability to persist inside macrophages has turned AIEC suspected of involvement in the formation of granulomas usually found in intestinal biopsies of CD patients [10]. Other AIEC strains with similar virulence properties to those of LF82 have been identified [11,12]. These strains are more similar to extraintestinal pathogenic (ExPEC) [13] than to classical diarrheagenic *E. coli* (DEC). We report here the results of characterization of an invasive *E. coli* detected in the ileum and stools of a CD patient, who underwent terminal ileum resection. Although this strain is able to attach to and invade epithelial cells, it does not fit all the criteria that define AIEC [14]. Differences in relation to AIEC include the possession of a classical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) O antigen and features of enterohemorrhagic and enteroaggregative pathotypes.

## Results

### Biochemical profile, O:H serotype and genetic markers

All of 10 randomly chosen colonies from an ileum biopsy MacConkey agar culture and an equal proportion and number of colonies from a stools culture in this

same medium were identified as *E. coli*. All 10 colonies from each clinical sample showed an identical biochemical profile (positive results for lysine decarboxylase, movement, glucose and lactose fermentation, gas from glucose fermentation and indole production; and negative results for urease, L-tryptophan deaminase, citrate utilization, and hydrogen sulfide production). Given the biochemical identity of all 20 colonies only an isolate (a single colony) from each clinical sample (D90/09 from stools and D92/09 from ileum) was selected for PCR screening, O:H typing, invasion assays, EcoR phylogroup and MLST classification. PCRs carried out to identify DEC typical genetic virulence markers and some serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATE) genes revealed the presence of *eae*, *stx1*, *aggR*, *sat*, *espC*, *tsh* and *vat* in both isolates. Figure 1 shows DEC markers results of the multiplex PCR, according to Toma et al. [15]. The identification of the *stx* variant (*stx1*) was performed in a separate PCR (not shown). Specific PCR for EcoR phylogroup classification enabled the assignment of the isolates in the B2 phylogroup. O and H antigens were indirectly determined by manually searching sequences in the isolates' genome (see below) matching genetic variants associated with the corresponding genes in GenBank. Thus, particular genome sequences of both isolates matched O126 gene cluster (DQ465248.1), and the H27 flagellin gene (AF345848.1) with 99% and 100% identity, respectively. The presence of O126 antigen in both isolates could be demonstrated by slide agglutination serological



**Figure 1** Agarose gel electrophoresis showing PCR amplicons of virulence genetic markers detected in isolates D90/09 and D92/09 (5, 6) and positive control strains (2, EAEC O42 *aggR*; 3, EHEC *eae* and *stx*; 4, *S. flexneri* *ipaH*). Lane 1, 100 bp DNA ladder.



tests. Similarly multilocus sequencing typing (MLST) of D90/09 and D92/9 was based on the genome's sequences, which upon being submitted to the Center for Genome Epidemiology website [16] was found to belong to ST3057 (Table 1).

#### Adherence and invasion

All 20 isolates (10 from stools and 10 from ileum biopsies) were adherents to Hep-2, showing the characteristic "stacked brick" aggregative phenotype (AA). Given the phenotypic similarity of all *E. coli* isolates from the ileum and stools, and the phenotypic and genetic similarity between D90/09 and D92/09 they were all considered as a single clone, henceforth referred to as D92/09 strain. Thus only this isolate was submitted to the additional characterization assays. D92/09 was invasive to Hep-2 and Caco-2 cells, with an average percentage of internalized bacteria of 0.2% and 0.8%, respectively. The equivalent invasiveness values for the positive control EIEC strain used in the tests was 0.2% in both cell lineages. In the assays with Caco-2, LF82 was also included and displayed an invasion percentage of 1.7%. The average invasiveness of D92/09 in macrophage J774 was 35%, as compared to 0.41% of LF82. In the assays to evaluate intracellular replication, the number of internalized bacteria after a 24 h post-infection period was double it was within 1 h, a capacity of intracellular proliferation six times lower than that of LF82 (Figure 2). The intracellular localization of bacteria was inferred from the result of gentamicin sensitivity test, which indicated absence of bacterial viability in cultures with drug concentrations lower than 10 µg/ml, 10 times inferior to that used to kill extracellular bacteria in the invasion assays. The invasive ability of D92/09 was confirmed by the observation of bacteria within Hep-2 cells in transmission electron microscopy (TEM) preparations (Figure 3A). The strain was found to be a weak biofilm former (mean SBF = 0.35 ± 0.5).

**Table 1 Alleles profile and other parameters of MLST typing of the D92/09 as belonging to the 3057<sup>(a)</sup>**

Locus*	% identity	HSP length	Allele length	Gaps	Allele
<i>adk</i>	100	536	536	0	290
<i>fumC</i>	100	469	469	0	54
<i>gyrB</i>	99,8	460	460	1	55
<i>icd</i>	100	518	518	0	324
<i>mdh</i>	100	452	452	0	35
<i>purA</i>	100	478	478	0	40
<i>recA</i>	99,7	381	510	1	223

<sup>(a)</sup>Output file created at the Center for Genome Epidemiology website [16].

\**adk*, adenylate kinase; *fumC*, fumarate hydratase; *gyrB*, DNA gyrase; *icd*, isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase; *mdh*, malate dehydrogenase; *purA*, adenylosuccinate dehydrogenase; *recA*, ATP/GTP binding motif.

#### Cytotoxic effect

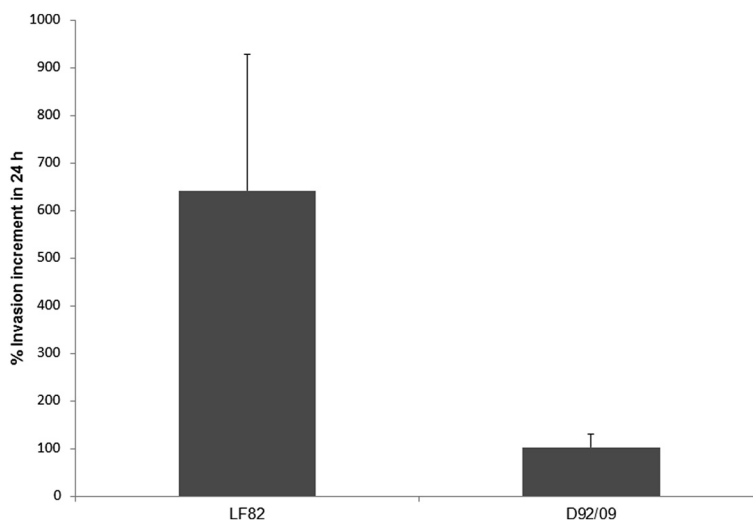
Figure 4 shows the effects of incubation of eight times diluted D92/09 bacterial culture supernatants and lysates from polymyxin treated bacteria on Vero cells. In wells treated with these suspensions, an average 57% and 34% of supernatants and lysates respectively had dead cells. The cytotoxicity of D92/09 lysate preparation was not significantly different from that induced by both LF82 and HB101 lysates and supernatants. Yet, the higher percentage of dead cells in wells added with D92/09 supernatants indicated a more powerful effect of this preparation than those caused by suspensions (lysates or supernatants) from those of LF82 and HB101. Nonetheless, cytotoxic effect of D92/09 supernatants was lower than that of supernatant and lysates from EDL 933 (Figure 4). Although not aiming to detect a cytotoxic effect, TEM carried out to detect intracellular bacteria also revealed a strong cytotoxic effect induced by the strain (Figure 3). In TEM preparations, cytotoxicity manifested through the upsurge of cell membrane vesicles (Figure 3B) and the formation of cytoplasm vacuoles (Figure 3C), eventually affecting the nucleus (Figure 3A). The level of toxicity was more pronounced in bacteria parasitized cells where the cytoplasm appeared almost completely disintegrated and the nucleus severely damaged (Figure 3A).

#### Preliminary genome analysis

The *E. coli* D92/09 DNA sequences were assembled in 341 contigs with an average size of 14,900 bp, totalizing 5,081,224 bp, 5842 coding sequence (CDS), 69 tRNAs and a GC content of 50,48%. A number of 145,211 bp from the whole genome corresponded to plasmid DNA, which showed 98% sequence identity with plasmid pO111\_H2 (NC\_013370.1). Chromosome sequences displayed 97% identity with O104:H4/2011C-3493 (NC\_018658.1), a strain isolated from an American citizen diagnosed with hemolytic uremic syndrome (HUS) and who had traveled to Germany during the 2011 local HUS outbreak. Both plasmid and chromosome sequences included DNA from multiple Enterobacteriaceae bacteriophages, such as the *stx1* converting phage. The average GC content of these sequences deviated significantly from the corresponding value of the total genome. An additional marker of the D92/09 genome, observed in this initial analysis, was the *E. coli* long polar fimbriae (*lfpA-D*) operon. The strain's sequence data have been submitted to the NCBI Sequence Read Archive under accession number SRP050886.

#### Discussion

Although most *E. coli* lives as commensals in the gut, some strains can be associated with several human diseases ranging from mild acute diarrhea to fatal HUS and meningitis [17]. *E. coli* has also been suspected of

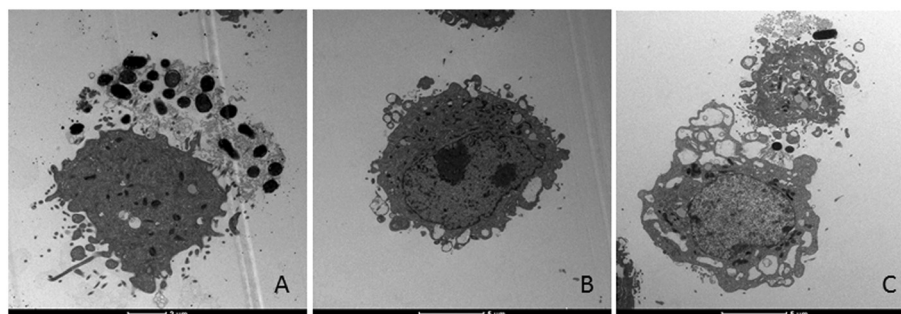


**Figure 2** Average percentage of LF82 and D92/09 invasiveness in macrophage line J774 within 24 h post-infection relative to the results obtained in a 3 h post-infection test.

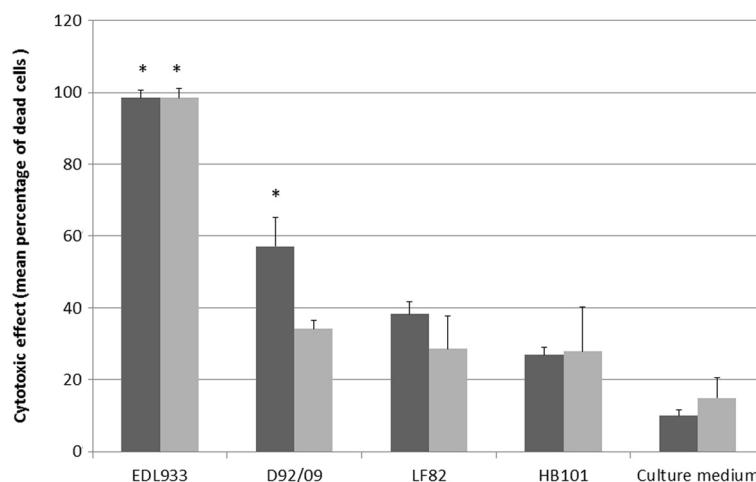
involvement with IBD because of its numerical elevation in the gut of IBD patients [2,7,18], contributing significantly for dysbiosis in the local microbiota, which is viewed as an important factor associated with the cause or aggravation of the symptoms of the disease [19]. Most of characterization studies have indicated that potentially virulent *E. coli* strains from IBD usually do not bear typical virulence features of classical diarrheagenic pathotypes and frequently are phenotypic and genetically related to ExPEC [6,20]. This can be exemplified by AIEC LF82 which bears no DEC virulence genetic markers and belong to O83, a serogroup usually found in association with cases of urinary tract infections [21]. In addition to LF82, at least two other AIEC strains also of the serogroup O83 had its whole genome sequenced and the results revealed genetic similarity among them [13,22,23]. This work presents features of a CD *E. coli* (labeled D92/09), which although proved to be adherent and invasive to cultured epithelial cells, displayed many differences in relation to

AIEC, regarding identification (typing) markers and virulence. It belongs to the O126:H27 serotype, to B2 EcoR phylogroup, which includes virulent strains usually possessing pathogenicity markers of UPEC [24] and to the ST3057, an uncommon clone first isolated from pig in Hong Kong in 2009 and considered as commensal [25]. Besides invasiveness, D92/09 harbors *eae* and *stx1* of enterohemorrhagic (EHEC) and *aggR* and aggregative adherence phenotype of enteroaggregative (EAEC) *E. coli*.

In many aspects, the interaction of D92/9 with cultured cells was also different from that of AIEC. For example, D92/9 uptake by macrophage J774 was 87.5 times as high as that of LF82 and the intracellular replication 24 h post-infection was only one sixth of that shown by LF82. The number of Hep-2 cells internalized D92/9 bacteria increased largely after 4 h post-infection (data not shown) and they proved to be not only invasive but also cytotoxic. Bacteria cytotoxicity could be noticed by cell detachment from bacteria infected Hep-2



**Figure 3** Transmission electron microscopy of Hep-2 cells preparations infected with strain D92/09, where a profound cytotoxic effect both in parasitized (A) and in bacteria free cells (B and C) are observed. In bacteria infected cell, an almost complete destruction leading to nuclear damage is seen (A). In bacteria free cells cytotoxic effect manifested by membrane vesicles (B) and large cytoplasm vacuoles formation (C).



**Figure 4** Action of eight times diluted filtrates from bacterial culture supernatants (dark bars) and filtrates from polymyxin lysed bacteria suspensions (gray bars) on Vero cells. Asterisks denotes statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) in comparison with LF82 in  $\chi^2$  test.

cell monolayers observed at the light microscope in the adhesion assays (not shown) and by TEM, where bacteria infected and non-infected cells appeared damaged. These observations were confirmed by the results of Vero cell assays, where diluted bacterial culture supernatants caused cell death in levels significantly higher than that induced by culture extracts from LF82 or HB101. Since the strain had *stx1*, these effects might have resulted from the action of Stx1, along with other cytotoxins such as the SPATEs, whose genes it also carries. However, the percentage of dead cells in monolayers treated with extracts from D92/9 was lower than that of monolayers under the action of corresponding EDL 933 products. One possible explanation for this difference is that D92/9 lacks Stx2, which is expressed by EDL 933 along with Stx1. In experimental infections, Stx1(+) rabbit diarrheagenic *E. coli* (RDEC) has been shown to cause multiple injuries and more severe inflammation than Stx1(-) RDEC [26]. Stx cytotoxins are made up of a single A subunit and five B subunits. The A subunit cleaves an adenine residue of the rRNA 28S component of the target eukaryotic cell ribosome, blocking protein synthesis. The B subunits bind to globotriaosylceramide (Gb3), a membrane glycolipid which was found to be widely distributed among rabbit absorptive villus epithelial cells [27]. Several works have reported the isolation of Stx producing *E. coli* (STEC) in ulcerative colitis [28-30], but as far as we are concerned, possibly no reports on the isolation STEC from a resected CD patient has been previously published. On the other hand, D92/09 displayed some AIEC features, such as the presence of *lpfA-D* which has been shown to contribute for bacteria invasiveness and translocation across M cells [8]. As a strain belonging to B2 phylogroup, it also harbored

*chuA*, a gene involved in heme acquisition and which has been correlated with bacterial persistence inside macrophages [31]. Serogroup O126 is very heterogeneous, including strains lacking known virulence markers [32], as well as potentially virulent strains of distinct pathotypes found both in humans and animals [33-35]. O126:H27 is a classical EPEC serotype previously associated with outbreaks [36] and sporadic cases of diarrhea [37]. The present work possibly is a rare report on the identification of this O:H type in CD.

In addition to *stx1*, the strain of the present study carried *eae* and *aggR*. The former encodes intimin which is responsible for ultrastructural lesions in the host cell membrane at the site of bacteria attachment. These alterations, known as attaching and effacing [38], are believed to be the main component of inflammatory reactions accompanying EHEC infections [27]. *aggR* is a transcriptional activator of multiple virulence factors in EAEC [17]. According to previous reports, EAEC are dominant in IBD patients [39,40] and some EAEC strains are able to form biofilm and to induce mucus secretion [41] and interleukin-8 expression [42] by intestinal epithelial cells. Additional virulence factors of EAEC include serine proteases auto transporters of *Enterobacteriaceae* (SPATE).

Preliminary genome analysis revealed a high genetic identity of D92/09 with a strain belonging to O104:H4 [43], serotype involved in the 2011 deadly HUS outbreak in Germany [44]. Phenotypic identity, such as the rare combination of characteristic from EAEC (AA adherence) and STEC (Stx1) was also observed. The connected action of these diverse pathogenicity factors was considered as the reason for the high virulence of the O104:H4 strains in the European HUS outbreak [44]. In

addition to these traits, D92/09 proved to be invasive, a property common to pathogens associated with intestinal inflammation, such as *Salmonella* and *Shigella*. Some particularities of the intestinal microenvironment in CD patients, such as a more permeable mucosa and altered mucus production, turn it even more vulnerable to installation of pathogens such as the strain of this study. In fact, the bacteria were detected in an intestinal site where multiple erosions were observed. While this observation cannot imply a causal relationship, an eventual involvement of the bacteria cannot be ruled out. Both chromosome and plasmid DNA displayed a number of bacteriophages, including the *stx1* converting phage, indicating that at least some of the strain's virulence properties were acquired by horizontal transfer. The plasmid DNA sequences were very similar to pO111\_2, detected in an O111 EHEC and which was previously shown to share multiple virulence genetic determinants with EHEC of other serogroups [45].

Previous work has reported an elevation in the number of *E. coli* in postoperative recurrence of CD [46]. Eventually, the possession of a diversified virulence background like that of D92/09 would represent an adaptive advantage within the augmented bacterial population in this clinical condition. Additional information drawn from a complete genome analysis as well as epidemiological studies will give a broader understanding of the significance of the presence of this *E. coli* in the resected CD patient.

## Methods

### Patient

The studied *E. coli* was isolated in December 2009 from stools and an ileum biopsy of a 51 year old woman who attended the Endoscopy unit of the University Hospital of the Botucatu Medical School/UNESP-SP, Brazil, for routine colonoscopy. The patient was diagnosed about one year earlier with small bowel CD complicated by an obstructive stenosis adjacent to the ileocecal valve and subsequently submitted to a terminal ileum and cecum resection. The patient had no clinical symptoms and was not under antibiotics or other drug treatment for at least two months preceding the clinical specimen collection. Yet, at colonoscopy examination several mucosal erosions (ca. 1–2 mm in size) and fibrinous lesions 6 mm in size could be observed in the ileum near to the anastomosis site. There was no colonoscopy finding in the mucosa of the entire length of the colon as well as in the rectum. The biopsy analyzed in this study was sampled from the ileum lesions. The patient was informed on the purpose of this study and manifested her agreement by signing a consent form. This study was approved by the local Committee on Ethics in Research. CD diagnosis was based on conventional clinical, colonoscopy and histopathological criteria [47].

### Bacterial isolation

Unless otherwise indicated, all the culture media and reagents for bacterial growth were manufactured by Oxoid (Basingstoke, Hampshire, England) and the culture conditions were 37°C per 18–24 h. *E. coli* was identified among colonies grown from a freshly collected (within 3 h after colonoscopy) ileum biopsy and a 2 days refrigerated stools sample directly streaked on MacConkey agar plates. A number of 10 lac+ colonies from these cultures were transferred to semi-solid MILi, modified Rugai [48] and Simmons citrate agars (BBL, Cockeysville, USA) wherein the following reactions could be detected: urease, indole, and H<sub>2</sub>S production, lactose and glucose fermentation, gas from glucose fermentation, sodium citrate utilization as single carbon source, bacterial movement, lysine decarboxylation and L-tryptophan deamination. Those colonies showing positive results for indole and glucose fermentation and negative results for H<sub>2</sub>S, L-tryptophan deamination and urease production were considered as *E. coli*. They were then incubated overnight in brain heart infusion broth and the resulting cultures mixed with 15% glycerol and stocked at –80°C.

### Adhesion assays

Bacterial adherence was tested in Hep-2 cells (ATCC CCL-23) monolayers grown to semi-confluence on glass coverslips put in 24 wells microplates (Kasvi, Curitiba, Brazil), filled with 0.7–1.0 ml minimal essential medium Eagle (MEME) (Sigma, St. Louis, USA), supplemented with 5% heat inactivated fetal calf serum (FCS) (Cultilab, Campinas, Brazil), streptomycin, penicillin (Sigma, St. Louis, USA) and amphotericin B (Sigma, St. Louis, USA). Unless otherwise indicated, in all steps below of adhesion and invasion assays, cells incubation was carried out at 37°C in normal (room) concentrations of CO<sub>2</sub> for bacteria, and in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for non-infected or bacteria infected epithelial cells.

After washing the monolayers thrice in phosphate buffered saline (PBS), 0.7–1.0 ml of fresh antibiotic free MEME/FCS containing 1% D-mannose (Sigma, St. Louis, USA) and 20 µl of overnight Luria Bertani (LB) bacterial cultures were added to each well and the plates incubated for 3 hours. Following 3 h incubation, the preparations were washed thrice in PBS, fixed in methanol (Labsinth, Diadema, Brazil) and stained in May-Grünwald and Giemsa (Sigma, St. Louis, USA). The coverslips were mounted on glass-slides and observed under light microscope for attached bacteria and adherence phenotype.

### Invasion assays

Hep-2 cells were cultured in 35 mm Ø Petri dishes to post confluent monolayers formed from an inoculum of 2×10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> seeded 20 h before in MEME/FCS and grown under the same conditions described above. After

the medium removal, the monolayers were washed thrice in PBS and infected with a number of bacterial cells 10 times as high as that of Hep-2 cells inoculum [multiplicity of infection (MOI) of 10]. The bacteria infected cells were incubated in antibiotic free MEME plus 10% FCS for three hours and washed four times after the removal of the medium. Fresh MEME plus 10% FCS and 100 µg/ml gentamicin (Sigma, St. Louis, USA), to kill extracellular bacteria, were then pipetted in the plates and the preparations were again incubated for one hour. Afterwards, the cells were washed thrice in PBS and lysed by incubation for 5 minutes at room temperature (RT) in 1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, USA). Cell lysates in volumes of 100 µl were spread on nutrient agar plates and incubated overnight. Internalized bacteria were quantitated by counting the number of colony forming units (CFU) grown on the plates. Bacterial invasion was expressed by the percentage of bacteria found in the lysates from the total inoculated on the cell monolayers. To exclude the possibility that the presence of bacteria in the lysates was due to gentamicin resistance, the strain was subjected to gentamicin minimal inhibitory concentration (MIC) determination by using Mic Evaluator strips (Oxoid, Basingstoke, England) on Mueller Hinton (Oxoid, Basingstoke, England) agar cultures, following the manufacturer's recommendations. The invasion assays were carried out in triplicates and included AIEC LF82 and EIEC reference strain as positive controls and an *E. coli* K12 HB101, as negative control. Invasion assays in Caco-2 (CCIAL 063) was performed as described above, except that a longer incubation time (48 h) was necessary for cell growing to post-confluence, the concentration of CO<sub>2</sub> in incubator was 10%, and the culture medium was Earle/199 (IAL, São Paulo, Brazil). The strain was also investigated for the ability to invade and replicate in the murine macrophage-like cell lineage J774 according to previously described procedures [10]. These cells monolayers were prepared by seeding and incubating for 18 h 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> in 35 mm Ø Petri dishes filled with RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA) plus 10% FCS, penicillin, streptomycin and amphotericin B. For the invasion tests, the medium was removed from the monolayers, the preparations were washed thrice in PBS, and fresh antibiotic free RPMI 1640 plus 10% FCS was added to the plates. The monolayers were then infected with overnight LB bacterial cultures, at a MOI of 10, and incubated for 2 h. Afterwards, the medium was removed, the monolayers were washed thrice, new RPMI 1640 plus 10% FCS and 100 µg/ml gentamicin was added, and the preparations was incubated for 1 h. To determine the bacterial ability to enter the cells, the monolayers were lysed by RT incubation in 1% Triton X-100 for 5 minutes and 100 µl of lysates were subjected to overnight cultures in nutrient agar, for UFC counting. In tests to evaluate the bacterial capacity of intracellular replication, new RPMI 1640 plus

10% FCS and 20 µg/ml gentamicin were added to the plates after the monolayers washings. The preparations were then subjected to an additional 24 h incubation period, the monolayers were lysed and the lysates incubated as above, for intracellular bacteria counting. As mentioned elsewhere all invasion assays described above were carried out in triplicates, with individual replicates assayed in distinct days and the results expressed as the average percentage of internalized bacteria from the total added to the cells.

#### Test for specific biofilm formation

The test to evaluate the strain ability to form biofilm followed the protocol of Martinez-Medina et al. [49], with some modifications. Bacteria were initially grown overnight in Luria-Bertani broth plus 5% glucose (LBG). Then 130 µl of LBG growth diluted 100 times in MEME/FCS plus 8% glucose (MEME/FCS/G) were dispensed in each well of 96 wells polystyrene microplates (Kasvi, Curitiba, Brazil). The plates were incubated at 30°C overnight and the optical density (OD) of the resulting culture measured at 620 nm. Afterwards, the cultures were removed, the wells were washed gently with PBS, and the plates dried. The preparations were stained with 1% Crystal violet solubilized in ethanol and the OD of the suspensions measured at 540 nm. EAEC strain 042 and bacteria-free MEME/FCS/G were respectively included as positive and negative controls in each test. Specific biofilm formation (SBF) was expressed by the formula:  $SBF = (A-B)/C$ , where A and B are the OD<sub>540</sub> of the stained culture suspensions and the stained bacteria-free MEME/FCS/G suspensions respectively and C is the OD<sub>620</sub> of the cultures in MEME/FCS/G. The studied strain and the controls were tested in 10x replicates. SBF values defined the ability of the strain to form biofilm as weak ( $\leq 0.5$ ), moderate (0.5-1.0), or strong ( $\geq 1.0$ ) [49].

#### PCR screening

PCRs were used for screening the bacteria for virulence genes that distinguish the main diarrheagenic *E. coli* (DEC) pathotypes [38] and to detect genes whose combination enable the classification of the strains in one of the four major phylogroups (A, B1, B2 and D) of the *E. coli* reference collection (EcoR).

The search for DEC specific genetic markers was carried out by multiplex PCRs designed by Toma et al. [15]. DEC distinguishing genes were intimin encoding *eae* of EPEC and EHEC; *stx*, sequence common to shiga cytotoxins family genes of shiga toxin *E. coli* (STEC); *aggR*, gene for AggR, a regulator of multiple EAEC virulence genes; *elt*, heat labile toxin gene of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC); and *ipaH*, plasmid borne IpaH gene of EIEC and *Shigella* sp. Negative control strain for the

PCR was *E. coli* HB101, and positive controls were the following: EHEC EDL933, for *eae* and *stx*; EAEC 042, for *aggR*; 40 T, for *elt*; and *Shigella flexneri* 2a 2457 T for *ipaH*. PCR for identification of *stx* variant (*stx1* or *stx2*) was done by multiplex PCR according to Paton et al. [50]. DNA template in each reaction mixtures were added as eluates of commercial purification kits (Qiagen, Valencia, USA) or crude cell lysates resulting from 10 minutes boiling of bacterial suspensions in sterilized water. The PCR cycling conditions, the primers (Eurofins, Huntsville, USA) concentrations and the remaining mix components were used according to the original reference protocol [15]. The *Taq* DNA polymerase, dNTP and other components of the master mix were used as ready commercial kits (NEB, Hitchin, UK). The template DNA was added to the mix components in a 0.2 ml polypropylene tube and the PCR reaction run in a MasterCycler ProS Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). PCR amplicons were electrophoresed in 1% agarose gels containing 10<sup>4</sup> x diluted Gel Red (Biotium, Hayward, USA) along with a100bp DNA size reference Marker (Norgen, Thorold, Canada). The electrophoresis separated DNA was observed in a gel doc EZ Imager (Biorad, Hercules, USA).

The PCR for assessment of EcoR phylogroups was based on the Clermont et al's protocol [51], with modifications suggested by Doumith et al. [52]. The following DNA sequences were used as targets of amplification: *gadA*, which encodes glutamate decarboxylate- $\alpha$ , *chuA*, a gene involved with heme transport in *Shigella* and EHEC, *yjaA*, a sequence of unknown function and TSPE.C2, an anonymous DNA fragment. The primers employed for amplification of each sequence, the PCR reaction conditions and mixture components followed previously published work [52] and the PCR products were detected according to the description above.

#### Assays in Vero cells

Evaluation of D92/09 cytotoxic effect was carried out on Vero cells (ATCC CCL-81), by testing supernatants and bacterial cell lysates from cultures grown on Penassay broth, as previously described [53]. EHEC strain EDL933 was used as positive control and *E. coli* K12 HB101 and bacteria-free culture medium were used as negative controls; for comparative purpose, AIEC strain LF82 was also tested. Bacterial cells lysates and culture supernatants were obtained as follows: 10 ml of overnight bacterial cultures were transferred to Erlenmeyer flasks containing 25 ml of fresh medium and incubated under shaking (150 rpm) for 18 h. The cultures were spun at 7000 x g for 10 min and the supernatants were filtered in 0.22  $\mu$ m nitrocellulose membranes and aliquoted. The pellets were washed twice in PBS, re-suspended in 1 mg/ml of polymyxin B solution (Sigma St Louis, USA, cod.

81271) and incubated at 37°C for 30 min. The resulting suspensions were then centrifuged at 7000 x g for 10 min, the supernatants carefully removed and filtered in 0.22  $\mu$ m nitrocellulose membranes.

The tests were performed with Vero cells incubated for 24 h, from an inoculum of 1.5x10<sup>5</sup> cells per well of a 96 wells polystyrene microplate (Kasvi, Curitiba, Brazil). Culture medium was removed from the plate, the cells were washed three times in PBS, and 150  $\mu$ l of doubling serial dilutions in Earle 199 medium (IAL, São Paulo, Brazil) of bacterial lysates filtrates or culture supernatants filtrates were added to each well. The plates were incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and the cells observed within 24, 48 and 72 h. The cytotoxic effect was expressed as the average percentage of dead cells per well.

#### Genome sequencing

D92/09 strain whole genome has been sequenced using the Ion torrent personal genome machine (PGM) (Life Technologies, Guilford, CT) with a 314 chip and 400 bp sequencing chemistry. DNA purification was performed from an overnight bacterial culture in LB using the QIAmp mini kit (Qiagen, Hilden Germany). The library was prepared using 1  $\mu$ g of DNA and an Ion Xpress Plus fragment library kit comprising the Ion Shear chemistry according to the user guide. The resulting DNA fragments were separated in an E-gel electrophoresis system (Life Technologies, Guilford, CT) from which 400 bp fragments were recovered. The fragments were then ligated to ion sphere particles (ISP) for clonal amplification in an emulsion PCR in the Ion OneTouch instrument (Life Technologies, Guilford, CT). After checking the quality of amplification, the ISP beads were loaded onto the 314 chip, where the sequencing proceeded in the PGM. *De novo* genome sequences assembly was carried out with the Assembler plugin using the *E. coli* strain LF82 genome as a reference. Sequence features and sequencing quality parameters were accessed by the Torrent Browser software, where the files required for sequence analyses were remotely read in the Torrent Server. The following tools were used for the data analyses: Artemis software [54], which determined the coding sequences (CDS), GC content and other genome features, and tRNA scan [55]. For the multilocus sequence typing, a fastaQ file was submitted to the Center for Genome Epidemiology website [16], which generated a file with the sequences of the house-keeping genes (*adk*, adenylate kinase; *fumC*, fumarate hydratase; *gyrB*, DNA gyrase; *icd*, isocitrate/isopropyl malate dehydrogenase; *mdh*, malate dehydrogenase; *purA*, adenylosuccinate dehydrogenase; *recA*, ATP/GTP binding motif) and the corresponding MLST. D90/09 genomic DNA was also sequenced, but it was done in a 314 chip together with DNA from 3 other strains (each identified

by a particular barcode and none related to this study). The purpose of this strain sequencing was only to identify some distinguishing features of the strains. Thus the low number of reads enabled the sequencing of only part of the D90/09 genome but with good sequence quality and quantity sufficient for MLST and O:H type identification.

### Transmission electron microscopy

A Hep-2 cells monolayer prepared as described above in a 75 cm<sup>2</sup> polystyrene flask microplates (Kasvi, Curitiba, Brazil) was inoculated with the strain D92/09 at a MOI of 10 and incubated for 5 h. The preparation was washed in PBS, treated with gentamicin (100 µg/ml in MEME/FCS) and incubated for 1 h. After an extensive washing in PBS, the bacteria infected cells were removed from the flask and centrifuged at 400 g. The supernatant was discarded and the cell pellet fixed in Karnovsky's glutaraldehyde solution for 12 h, washed thrice in phosphate buffer 0.1 M pH 7.3 (PB) and post-fixed in 1% OsO<sub>4</sub> in PB, for 2 h. The preparation was washed in distilled water and immersed in uranyl acetate 0.5% for 2 h. After dehydration in a graded series of acetone, the pellet was immersed in a 1:1 araldite-acetone mixture for 12 h at room temperature and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections from the resin blocs were cut and contrasted with uranyl acetate and lead citrate, for the observation at the microscope.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

ACSS executed most of laboratory experiments. LYS got and managed the patient's clinical information. FGR conducted the patient's colonoscopic examinations. JR executed some of laboratory experiments, compiled the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

Dr. Nicholas Barnich from the Université d'Auvergne, Clermont Ferrand, France, who kindly provided the reference *E. coli* LF82 strain and Dr. Alexandrina Sartori from Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences of UNESP, Brazil who provided the macrophage line J774. This study was supported by FAPESP grant 2013/04475-3 given to J.R.

### Author details

<sup>1</sup>Laboratory of Medical Bacteriology, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences of the State University of São Paulo (UNESP), Brazil, Distrito de Rubião Junior, CEP 18618-970 Botucatu, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School of the State University of São Paulo (UNESP), Brazil, Distrito de Rubião Junior, CEP 18618-970 Botucatu, SP, Brazil.

Received: 20 October 2014 Accepted: 6 January 2015

Published online: 29 January 2015

### References

- Winter SE, Winter MG, Xavier MN, Thiennimitr P, Poon V, Keestra AM, et al. Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. *Science*. 2013;339(6120):708–11.
- de Souza HL, de Carvalho VR, Romeiro FG, Sassaki LY, Keller R, Rodrigues J. Mucosa-associated but not luminal *Escherichia coli* is augmented in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut Pathogens*. 2012;4(1):21.
- Chassaing B, Rolhion N, de Vallee A, Salim SY, Prorok-Hamon M, Neut C, et al. Crohn disease-associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest*. 2011;121(3):966–75.
- Prorok-Hamon M, Friswell MK, Alswied A, Roberts CL, Song F, Flanagan PK, et al. Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing IpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut*. 2014;63(5):761–70.
- Dogan B, Scherl E, Bosworth B, Yantiss R, Altier C, McDonough PL, et al. Multidrug resistance is common in *Escherichia coli* associated with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(1):141–50.
- Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2 + D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2007;56(5):669–75.
- Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998;115(6):1405–13.
- Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *IJMM*. 2002;292(3–4):185–93.
- Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*. 1999;67(9):4499–509.
- Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Adherent Invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun*. 2001;69(9):5529–37.
- Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*. 2004;127(1):80–93.
- Eaves-Pyles T, Allen CA, Taormina J, Swidsinski A, Tutt CB, Jezek GE, et al. *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *IJMM*. 2008;298(5–6):397–409.
- Nash JH, Villegas A, Kropinski AM, Aguilar-Valenzuela R, Konczyk P, Mascarenhas M, et al. Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics*. 2010;11:667.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;127(2):412–21.
- Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, et al. Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2003;41(6):2669–71.
- Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1355–61.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev Microbiol*. 2004;2(2):123–40.
- Conte MP, Longhi C, Marazzato M, Conte AL, Aleandri M, Lepanto MS, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Res Notes*. 2014;7:748.
- Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1489–99.
- Rhodes JM. The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2007;56(5):610–2.
- Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpour Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013;12:8.
- Clarke DJ, Chaudhuri RR, Martin HM, Campbell BJ, Rhodes JM, Constantinidou C, et al. Complete genome sequence of the Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain HM605. *J Bacteriol*. 2011;193(17):4540.
- Miquel S, Peyretailade E, Claret L, de Valle'e A, Dossat C, Vacherie B, et al. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS ONE*. 2010;5(9):e12714. doi:10.1371/journal.pone.0012714.
- Boyd EF, Hartl DL. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *J Bacteriol*. 1998;180(5):1159–65.

25. MLST database at UoW. [http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/Downloads\_HTML]
26. Sjogren R, Neill R, Rachmilewitz D, Fritz D, Newland J, Sharpnack D, et al. Role of Shiga-like toxin I in bacterial enteritis: comparison between isogenic *Escherichia coli* strains induced in rabbits. *Gastroenterology*. 1994;106(2):306–17.
27. Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev*. 1996;60(1):167–215.
28. Farina C, Caprioli A, Luzzi I, Sonzogni A, Goglio A. Ulcerative colitis precipitated by a verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection. *Ital J Gastroenterol*. 1995;27(9):498–500.
29. von Wulffen H, Russmann H, Karch H, Meyer T, Bitzan M, Kohrt TC, et al. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O2:H5 isolated from patients with ulcerative colitis. *Lancet*. 1989;1(8652):1449–50.
30. Ljungh A, Eriksson M, Eriksson O, Henter JI, Wadstrom T. Shiga-like toxin production and connective tissue protein binding of *Escherichia coli* isolated from a patient with ulcerative colitis. *Scand J Infect Dis*. 1988;20(4):443–6.
31. Dogan B, Suzuki H, Herlekar D, Sartor RB, Campbell BJ, Roberts CL, et al. Inflammation-associated adherent-invasive *Escherichia coli* are enriched in pathways for use of propanediol and iron and M-cell translocation. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(11):1919–32.
32. Yam WC, Robins-Browne RM, Lung ML. Genetic relationships and virulence factors among classical enteropathogenic *Escherichia coli* serogroup O126 strains. *J Med Microbiol*. 1994;40(4):229–35.
33. Cortes C, De la Fuente R, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Dhahi G, et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. *Vet Microbiol*. 2005;110(1–2):67–76.
34. Rich C, Favre-Bonte S, Sapena FDR, Joly B, Forestier C. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;173(1):55–61.
35. Orden JA, Cortes C, Horcajo P, De la Fuente R, Blanco JE, Mora A, et al. A longitudinal study of verotoxin-producing *Escherichia coli* in two dairy goat herds. *Vet Microbiol*. 2008;132(3–4):428–34.
36. Moyenuddin M, Wachsmuth IK, Moseley SL, Bopp CA, Blake PA. Serotype, antimicrobial resistance, and adherence properties of *Escherichia coli* strains associated with outbreaks of diarrheal illness in children in the United States. *J Clin Microbiol*. 1989;27(10):2234–9.
37. Ishiguro F, Nakamura M, Asada T. [Four serotypes highly positive for pathogenic factor-related genes found among *Escherichia coli* isolates from sporadic diarrheal cases in Fukui Prefecture]. *J Jap Assoc Infect Dis*. 2002;76(9):730–7.
38. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(1):142–201.
39. Thomazini CM, Samegima DA, Rodrigues MA, Victoria CR, Rodrigues J. High prevalence of aggregative adherent *Escherichia coli* strains in the mucosa-associated microbiota of patients with inflammatory bowel diseases. *IJMM*. 2011;301(6):475–9.
40. Watanabe E, Romeiro F, Sassaki L, Keller R, Rodrigues J. Enteroaggregative *Escherichia coli* seems to proliferate in the terminal portion of the colon of IBD patients. *Inflam Bowel Dis*. 2012;18:S112.
41. Nataro JP, Steiner T, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(2):251–61.
42. Steiner TS, Lima AA, Nataro JP, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *J Infect Dis*. 1998;177(1):88–96.
43. Ahmed SA, Awosika J, Baldwin C, Bishop-Lilly KA, Biswas B, Broomall S, et al. Genomic comparison of *Escherichia coli* O104:H4 isolates from 2009 and 2011 reveals plasmid, and prophage heterogeneity, including shiga toxin encoding phage stx2. *PLoS One*. 2012;7(11):e48228.
44. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Kock R, Fruth A, Bauwens A, et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(9):671–6.
45. Ogura Y, Ooka T, Iguchi A, Toh H, Asadulghani M, Oshima K, et al. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(42):17939–44.
46. Neut C, Bulois P, Desreumaux P, Membre JM, Lederman E, Gambiez L, et al. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gast*. 2002;97(4):939–46.
47. Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007;133(5):1670–89.
48. Toledo MRF, Fontes CF, Trubalsi LR. EPM - Modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização do teste de produção de gás a partir de glucose, H<sub>2</sub>S, urease e triptofano desaminase. *Rev Microbiol São Paulo*. 1982;12:309–15.
49. Martinez-Medina M, Naves P, Blanco J, Aldegue X, Blanco JE, Blanco M, et al. Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiol*. 2009;9:1–16.
50. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J Clin Microbiol*. 1998;36(2):598–602.
51. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(10):4555–8.
52. Doumith M, Day MJ, Hope R, Wain J, Woodford N. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):3108–10.
53. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 1985;151(5):775–82.
54. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, et al. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. 2000;16(10):944–5.
55. Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(5):955–64.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





### **3. CAPÍTULO 3 – *DRAFT* E ANOTAÇÃO DO GENOMA DA CEPA D92/09**

#### **a. *Draft* do genoma da cepa D92/09**

# Draft Genome Sequence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strain D92/09

Ana Carolina Da Silva Santos,  Josias Rodrigues

Laboratory of Medical Bacteriology, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences of the State University of São Paulo (IBB-UNESP), Botucatu SP, Brazil

***Escherichia coli* is suspected to be involved with Crohn's disease. Adherence and invasion to epithelial cells are properties commonly observed in these bacteria. Here, we present a draft genome sequence of *E. coli* D92/09, a multidrug-resistant strain, which besides showing these properties produces Shiga cytotoxin-1 and possibly other toxins.**

Received 19 June 2015 Accepted 24 June 2015 Published 30 July 2015

**Citation** Da Silva Santos AC, Rodrigues J. 2015. Draft genome sequence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain D92/09. *Genome Announc* 3(4):e00805-15. doi:10.1128/genomeA.00805-15.

**Copyright** © 2015 Da Silva Santos and Rodrigues. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Josias Rodrigues, [josias@ibb.unesp.br](mailto:josias@ibb.unesp.br).

We reported recently the detection, in a Crohn's disease (CD) patient, of an *Escherichia coli* strain displaying virulence markers of three classical diarrheagenic pathotypes: enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) (*eae* and *stx1*), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) (*aggR* and aggregative adherence to HEp-2 cells), and enteroinvasive *E. coli* (EIEC) (invasive ability into cultured eukaryotic cells) (1). The patient was an adult woman who underwent ileal resection 1 year earlier to repair an intestinal obstruction. The bacteria, which were detected both in ileal biopsy and stool samples from a patient, probably consisted of a dominant or a single *E. coli* clone, because all of 20 colonies picked from the MacConkey agar plates streaked with the clinical samples showed phenotypic (biochemical profile and interactions with cultured cells) and genetic (EcoR phylogroup, virulence gene profile and multilocus sequence type) similarity (1). One of the ileal mucosa isolates, designated strain D92/09, had its whole genome sequenced using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) platform. Bacterial DNA was extracted from LB overnight cultures with the QiAamp minikit (Qiagen, Hilden, Germany), and the genome library was prepared using 1  $\mu$ g of DNA and an Ion Xpress Plus fragment library kit comprising the Ion Shear chemistry, according to the user's guide. The resulting DNA fragments were separated in an E-gel electrophoresis system (Life Technologies, Guilford, CT), from which 400-bp fragments were recovered. The fragments were then ligated to Ion Sphere particles (ISP) for clonal amplification in an emulsion PCR carried out with the Ion OneTouch instrument (Life Technologies). After checking the quality of amplification, the ISP beads were loaded onto a 314 Chip, where the sequencing proceeded in the PGM.

Genome sequence features and sequencing quality parameters were available in files accessed in the Torrent Server by the Torrent browser software, which revealed a total of 399,241 reads comprising 16.5 $\times$  genome coverage. *De novo* genome sequence assembly was carried out with the Assembler plugin, using as a reference the adherent-invasive *E. coli* strain LF82 genome (2), to which 76% of the D92/09 strain bases were aligned. This whole genome (WG) of the strain is composed of 5,079,894 bases distributed in 343 con-

tigs, which were reordered with the Mauve aligner software (3) for annotation in the RAST server (4). The D92/09 WG has a G+C content of 50.47%. A total of 5,893 coding sequences (CDS), 18 rRNAs, and 66 tRNAs were identified. Virulence-related subsystem features consisted of 11 adhesion-associated factors, 103 sequences conferring resistance to antibiotics and toxic compounds, and 18 *Mycobacterium*- and *Listeria*-related elements necessary for cell invasion and intracellular persistence; in addition, 88 phage or prophage sequences were identified. The D92/09 WG showed 97% identity with recently described nitrofurantoin-resistant sequence type 2747 (ST2747) (5) and STEC O104:H4/2011C-3493 (NCBI reference sequence NC\_018658.1) *E. coli* strains. A total of 145,211 bp corresponded to plasmid sequences, part of which matched pO111:H- (NCBI reference sequence NC\_013370.1) and several antibiotic resistance factors, including the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) gene carrying plasmid pH 2332 166 (NCBI reference sequence NC\_025175.1).

**Nucleotide sequence accession numbers.** This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession no. [LEKZ000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LEKZ000000000). The version described in this paper is version LEKZ01000000.

## ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by FAPESP grant 2013/04475-3 (to J.R.).

## REFERENCES

- Da Silva Santos AC, Gomes Romeiro F, Sassaki Y, Rodrigues J. 2015. *Escherichia coli* from Crohn's disease patient displays virulence features of enteroinvasive (EIEC), enterohemorrhagic (EHEC), and enteroaggregative (EAEC) pathotypes. *Gut Pathog* 7:2. <http://dx.doi.org/10.1186/s13099-015-0050-8>.
- Miquel S, Peyretailade E, Claret L, de Vallée A, Dossat C, Vacherie B, Zineb el H, Segurens B, Barbe V, Sauvanet P, Neut C, Colombel JF, Medigue C, Mojica FJ, Peyret P, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A. 2010. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS One* 5:5. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012714>.

3. Rissman AI, Mau B, Biehl BS, Darling AE, Glasner JD, Perna NT. 2009. Reordering contigs of draft genomes using the Mauve aligner. *Bioinformatics* 25:2071–2073. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp356>.
4. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
5. Xavier BB, Vervoort J, Stewardson A, Adriaenssens N, Coenen S, Harbarth S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2014. Complete genome sequences of nitrofurantoin-sensitive and resistant *Escherichia coli* ST540 and ST2747 strains. *Genome Announc* 2(2):e00239-14. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00239-14>.

### **b. Anotação do genoma da cepa D92/09**

O genoma da *E. coli* D92/09 apresentou 5983 CDS [o número de CDS (5893), informado na publicação das páginas anteriores está incorreto]. Estas sequências foram incluídas em 7 categorias: Metabolismo, Componentes estruturais, Transporte de membrana/resposta ao estresse, Respiração/reprodução, Regulação/sinalização/motilidade, Patogenicidade e outros. Um mapa ilustrativo da distribuição destas funções, de tRNA, rRNA, e sequências de elementos móveis presentes no cromossoma bacteriano é apresentado na Figura 1. A grande maioria das CDS corresponde a sequências envolvidas em funções de biossíntese e metabolismo (componentes estruturais) e 3%, associadas a características de virulência, das quais quase 70% correspondendo à capacidade de resistência a drogas (Figura 2). Além da resistência a drogas, o genoma de D92/09 apresentou marcadores associados à produção de bacteriocinas, adesão e invasão celular. Entre estes últimos incluem-se fatores de virulência de *Mycobacterium* (operon LSU) e *Listeria* (proteína de superfície internalin-like), que são patógenos invasores típicos.

Do total de 88 sequências de elementos móveis (profagos, fagos e elementos transponíveis), 60 foram identificadas no cromossomo (Figura 1). A Tabela 2 apresenta as 5 linhagens de *E. coli* cujo genoma apresentou maior identidade com o cromossomo da cepa D92/09, numa maior extensão de cobertura, quando alinhadas por Blast. ECONIH1, ST2747 e UMNO26 foram originalmente isoladas de infecções intestinais e são multirresistentes a drogas, enquanto que O42 e RM 9387 são associadas a infecções intestinais, sendo esta última uma STEC do sorotipo O104:H7 isolada de bovinos (Yan *et al.*, 2015).

Do total de 5.08Mb do genoma de D92/09, 4.97Mb corresponderam a DNA cromossomal e o restante a plasmídeo. Como não foi feita uma análise do DNA plasmidial em separado, não foi possível saber o número total de plasmídios que faz parte do genoma da bactéria. Estas sequências de DNA plasmidial apresentaram identidade superior a 90% com uma série de plasmídios de resistência a drogas relacionados ao pO111\_H2, detectado em uma cepa de STEC (Ogura *et al.*, 2009). A Figura 3 mostra o alto grau de semelhança entre pO111:H2 e as sequências de DNA plasmidial de D92/09.

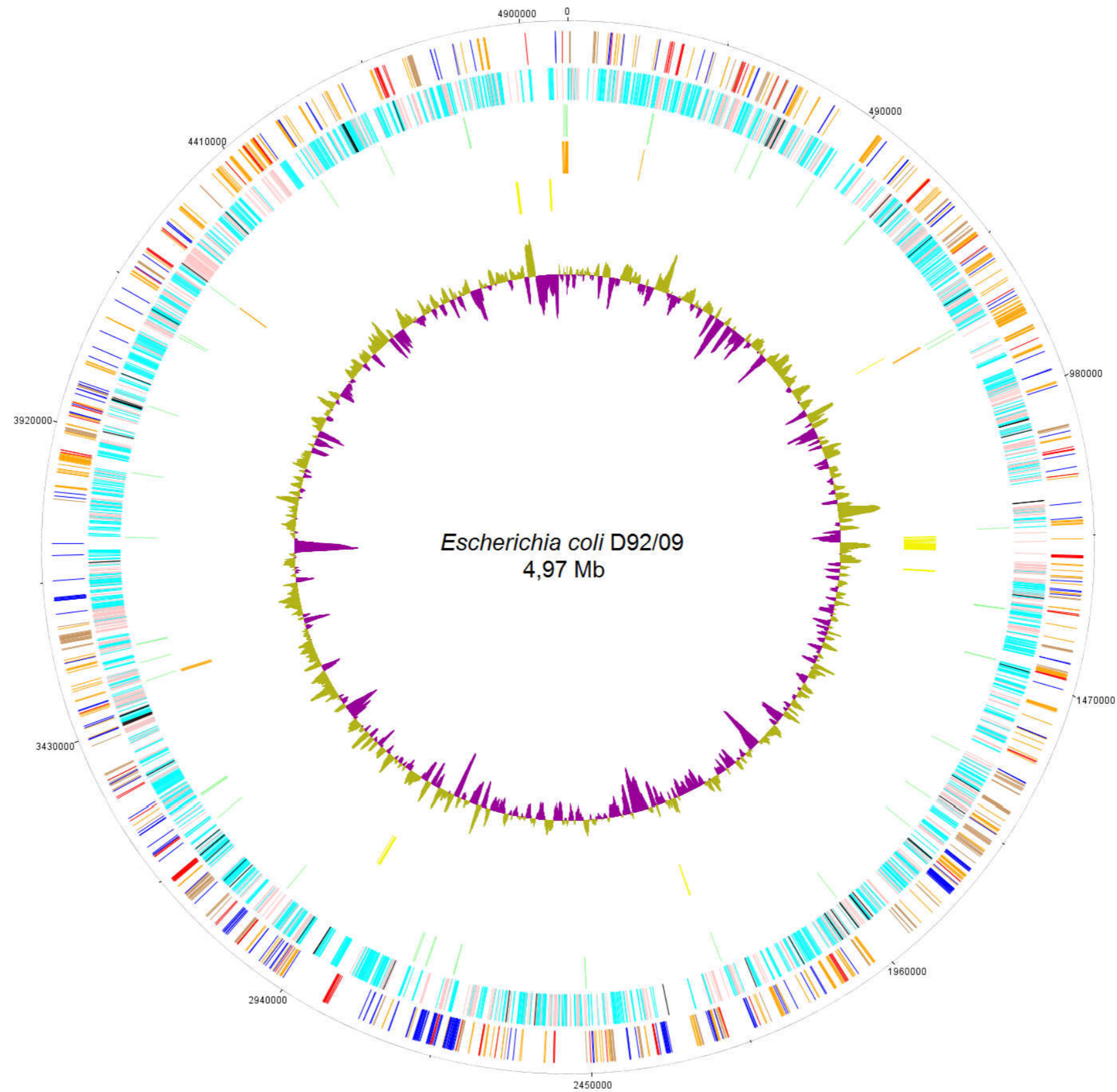
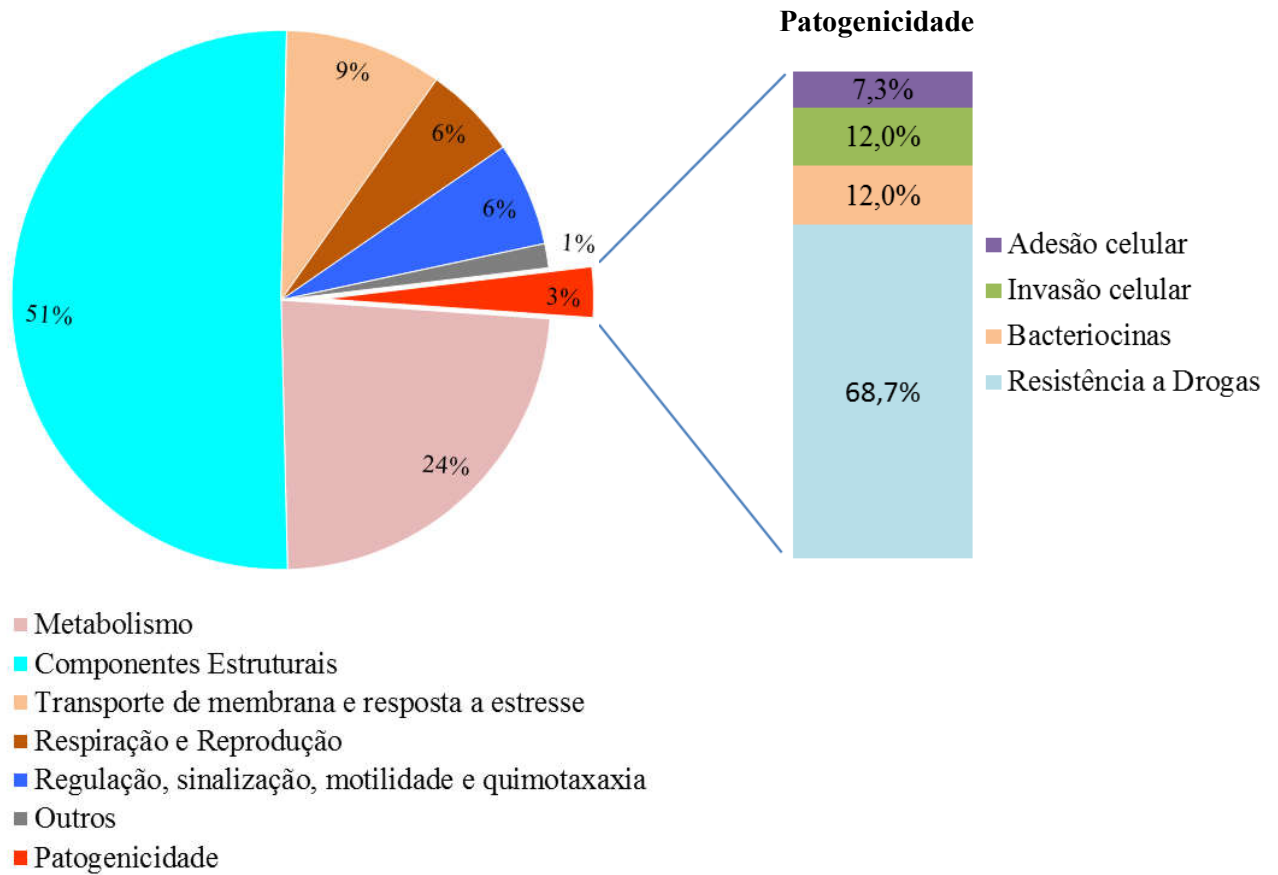


Figura 1. Mapa ilustrativo de seqüências codificantes (CDS) e não codificantes (tRNA e rRNA) do DNA cromossomal da *E. coli* D92/09. Legenda: De fora para dentro: fita “Forward”, fita “Reverse”, tRNA (em verde), rRNA (em laranja), seqüência de Fagos (em amarelo), Desvio GC. Cores nas 2 fitas mais externas (CDS): genes relativos a Componentes estruturais (azul claro), Metabolismo (rosa), Transporte de membrana e resposta ao estresse (laranja), Respiração e reprodução (marrom), Regulação e sinalização celular, motilidade e quimiotaxia (azul escuro), Patogenicidade (vermelho) e outras funções (preto).



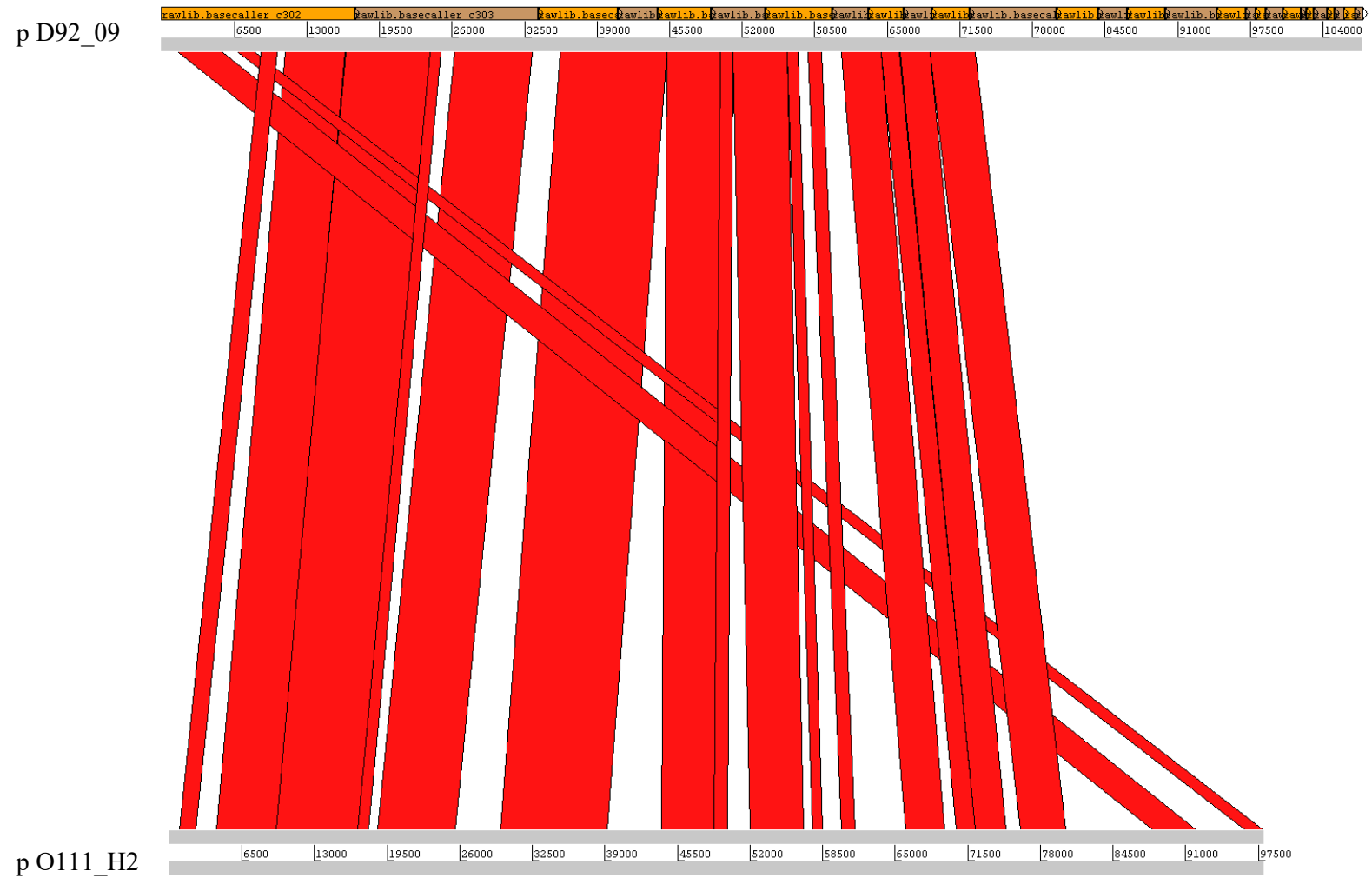
**Figura 2.** Proporção da diferentes categorias de funções identificadas no genoma da *E. coli* D92/09. O detalhe destaca a grande proporção de CDS envolvidas com resistência a drogas.

**Tabela 2.** Linhagens de *E. coli* apresentando maior identidade com o cromossoma da cepa D92/09 \*.

<b>Linhagem</b>	<b>Cobertura (%)<sup>a</sup></b>	<b>Identidade (%)</b>	<b>Acesso GenBank</b>	<b>Referências</b>
<b>ECONIH1</b>	90	98	NZ_CP009859.1	(Conlan <i>et al.</i> , 2014)
<b>042</b>	88	97	NC_017626.1	(Chaudhuri <i>et al.</i> , 2010)
<b>ST2747</b>	87	97	NZ_CP007392.1	(Xavier <i>et al.</i> , 2014)
<b>UMN026</b>	88	97	NC_011751.1	(Touchon <i>et al.</i> , 2009)
<b>RM9387</b>	84	97	NZ_CP009104.1	(Yan <i>et al.</i> , 2015)

\* O valor de E em todos os alinhamentos foi igual a zero

<sup>a</sup> Porcentagem do genoma de D92/09 que apresentou a identidade informada



**Figura 3.** Ilustração mostrando alta similaridade no alinhamento de seqüências plasmidais de D92/09 (pD92/09) e pO111:H2. Gráfico gerado pelo ACT (Carver *et al.*, 2005)



**BREVE DISCUSSÃO E**

**CONCLUSÃO**

---

---

A DC é a principal modalidade das DII que, embora sejam patologias de causa desconhecida, são seguramente associadas a vários fatores, entre os quais a microbiota intestinal. Como principal representante deste microbioma, em função do grande conhecimento disponível sobre *E. coli*, seu envolvimento com estas doenças tem sido há tempos investigado. Os primeiros achados destes estudos deram conta de um aumento da concentração destas bactérias na microbiota de portadores de DII e trabalhos de caracterização destas cepas revelaram que a população bacteriana aumentada consistia de cepas com grande capacidade de interação celular (adesão e invasão). A intensificação destes estudos permitiu a definição e reconhecimento de AIEC como um novo patótipo de *E. coli*. Na hipótese da haver causa infecciosa da DC, a AIEC é hoje vista como um dos agentes infecciosos mais suspeitos de envolvimento com a doença (Agus *et al.*, 2014).

Partindo das informações acima, iniciamos o estudo com a caracterização de uma coleção de cepas de *E. coli* isoladas de casos de DC, no sentido de identificar particularmente bactérias aderentes e invasoras. Não foi identificada nenhuma AIEC entre as amostras estudadas, possivelmente devido ao baixo número de cepas investigadas e/ou de variações na técnica empregada. Todavia, detectamos uma cepa invasora com características particulares, notadamente propriedades comuns a DEC, o que é incomum entre isolados de portadores de DII. Esta cepa foi extensivamente estudada e reconhecida como uma STEC, com propriedades de virulência de outros patótipos de *E. coli*. Este trabalho de dissertação consistiu particularmente na caracterização fenotípica e análise do genoma desta bactéria. As informações obtidas sugerem se tratar de uma cepa claramente patogênica, capaz não apenas de invadir, mas também de provocar efeitos citotóxicos na célula hospedeira. No entanto, o papel destes fatores de patogenicidade na doença teria que ser testado, ao mesmo tempo em que dados de epidemiologia precisam ser obtidos. A análise genômica revelou um grande número de fatores genéticos associados à resistência a drogas. Conforme hipótese já aventada, acreditamos que esta cepa, embora seja de um sorotipo incomum no ambiente hospitalar, pode ter sido adquirido neste local (Rodrigues, 2015). A variedade de marcadores de virulência identificados no genoma da cepa, aliada ao grande número de sequências de fagos, sugere que estas propriedades podem ter sido adquiridas num passado recente. Entre os marcadores se incluem genes de patógenos tipicamente invasores, como *Micobacterium* e *Listeria*. O modelo de patogênese de AIEC, em muito se assemelha àquele verificado para *M. tuberculosis* (Rolhion e Darfeuille-Michaud, 2007). Na verdade, assim como AIEC, *M. avium paratuberculosis* (MAP), tem sido apontado como agente infeccioso da DII, dada a

semelhança entre a doença de Crohn e o Mal de Johne causado por MAP em bovinos (Frank, 2008).

Como conclusão deste trabalho: 1) não foram identificadas cepas de AIEC entre os isolados de *E. coli*, possivelmente devido ao pequeno número de cepas analisado, 2) Detectamos uma cepa com propriedades de virulência incomum, no sentido de combinar propriedades de virulência de múltiplos patótipos e ao mesmo tempo dotada de um grande número de marcas de resistência a droga, bem como de um elevado número de sequências de fagos e transposons, sugerindo aquisição recente e 3) O significado dos achados deste trabalho depende da investigação da prevalência de bactérias com o mesmo perfil desta aqui estudada entre portadores de doença de Crohn, bem como em testar o papel dos fatores de patogenicidade em modelos animais.

# **REFERÊNCIAS**

---

---

AGUS, A. et al. Understanding host-adherent-invasive Escherichia coli interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 567929, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25580435> >.

ARDIZZONE, S.; BIANCHI PORRO, G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. **J Intern Med**, v. 252, n. 6, p. 475-96, Dec 2002. ISSN 0954-6820 (Print)

0954-6820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12472908> >.

AZIZ, R. K. et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, p. 75, 2008. ISSN 1471-2164 (Electronic)

1471-2164 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18261238> >.

BARNICH, N. et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. **J Clin Invest**, v. 117, n. 6, p. 1566-74, Jun 2007. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525800> >.

BARNICH, N.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 42, p. 5571-6, Nov 14 2007. ISSN 1007-9327 (Print)

1007-9327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17948930> >.

BOUDEAU, J. et al. Invasive ability of an Escherichia coli strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. **Infect Immun**, v. 67, n. 9, p. 4499-509, Sep 1999. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10456892> >.

CARTER, M. J.; LOBO, A. J.; TRAVIS, S. P. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut**, v. 53 Suppl 5, p. V1-16, Sep 2004. ISSN 0017-5749 (Print)

0017-5749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306569> >.

CARVER, T. J. et al. ACT: the Artemis Comparison Tool. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3422-3, Aug 15 2005. ISSN 1367-4803 (Print)

1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15976072> >.

CHASSAING, B.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. The sigma(E) Pathway Is Involved in Biofilm Formation by Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 1, p. 76-84, Jan 2013. ISSN 0021-9193. Disponível em: <<Go to ISI>://000316959000011 >.

CHAUDHURI, R. R. et al. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative Escherichia coli strain 042. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8801, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20098708> >.

CONLAN, S. et al. Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 254, p. 254ra126, Sep 17 2014. ISSN 1946-6242 (Electronic)

1946-6234 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25232178> >.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 26-38, Jan 2010. ISSN 1740-1534 (Electronic)

1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19966814> >.

DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmun Rev**, v. 3, n. 5, p. 394-400, Jul 2004. ISSN 1568-9972 (Print)

1568-9972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15288007> >.

DARFEUILLE-MICHAUD, A. et al. High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 127, n. 2, p. 412-21, Aug 2004. ISSN 0016-5085 (Print)

0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15300573> >.

DARFEUILLE-MICHAUD, A. et al. Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 115, n. 6, p. 1405-13, Dec 1998. ISSN 0016-5085 (Print)

0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834268> >.

DARLING, A. E.; MAU, B.; PERNA, N. T. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11147, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20593022> >.

DATASUS. **Estatísticas Vitais** 2015.

DETOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. Epm - a Modification of Rugai and Araujo Medium for Simultaneous Test of Gas-Production from Glucose, H<sub>2</sub>S, Urease and Tryptophan Deaminase. **Revista De Microbiologia**, v. 13, n. 4, p. 309-315, 1982. ISSN 0001-3714. Disponível em: <<Go to ISI>://A1982QQ45000001 >.

DONNENBERG, M. S. **Escherichia coli, 2nd Edition**

**Pathotypes and Principles of Pathogenesis**. 2nd edition. Academic Press, 2013. 616 ISBN 9780123977779.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 115, n. 1, p. 182-205, Jul 1998. ISSN 0016-5085 (Print)

0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9649475> >.

\_\_\_\_\_. Inflammatory bowel disease pathogenesis: Where are we? **J Gastroenterol Hepatol**, v. 30 Suppl S1, p. 12-18, Mar 2015. ISSN 1440-1746 (Electronic)

0815-9319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25827798> >.

FRANK, D. N. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease.

**Lancet Infect Dis**, v. 8, n. 6, p. 345; author reply 345-6, Jun 2008. ISSN 1473-3099 (Print)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18501847> >.



GLASSER, A. L. et al. Adherent invasive Escherichia coli strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. **Infect Immun**, v. 69, n. 9, p. 5529-37, Sep 2001. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500426> >.

HENDRICKSON, B. A.; GOKHALE, R.; CHO, J. H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 1, p. 79-94, Jan 2002. ISSN 0893-8512 (Print)

0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781268> >.

JASKOWSKI, T. D.; LITWIN, C. M.; HILL, H. R. Analysis of serum antibodies in patients suspected of having inflammatory bowel disease. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 6, p. 655-60, Jun 2006. ISSN 1556-6811 (Print)

1556-679X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760323> >.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic Escherichia coli. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 123-40, Feb 2004. ISSN 1740-1526 (Print)

1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040260> >.

KOTLOWSKI, R. et al. High prevalence of Escherichia coli belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 56, n. 5, p. 669-75, May 2007. ISSN 0017-5749 (Print)

0017-5749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17028128> >.

LARSEN, M. V. et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 1355-61, Apr 2012. ISSN 1098-660X (Electronic)

0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238442> >.

LEONE, V.; CHANG, E. B.; DEVKOTA, S. Diet, microbes, and host genetics: the perfect storm in inflammatory bowel diseases. **J Gastroenterol**, v. 48, n. 3, p. 315-21, Mar 2013. ISSN 1435-5922 (Electronic)

0944-1174 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23475322> >.

MARTINEZ-MEDINA, M.; GARCIA-GIL, L. J. Escherichia coli in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive Escherichia coli pathogenicity. **World J Gastrointest Pathophysiol**, v. 5, n. 3, p. 213-27, Aug 15 2014. ISSN 2150-5330 (Electronic)

2150-5330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25133024> >.

MECONI, S. et al. Adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro. **Cell Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 1252-61, May 2007. ISSN 1462-5814 (Print)

1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223928> >.

OCHMAN, H.; SELANDER, R. K. Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations. **Journal of Bacteriology**, v. 157, n. 2, p. 690-3, Feb 1984. ISSN 0021-9193 (Print)

0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6363394> >.

OGURA, Y. et al. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. **J Biol Chem**, v. 276, n. 7, p. 4812-8, Feb 16 2001. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087742> >.

OGURA, Y. et al. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic Escherichia coli. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 42, p. 17939-44, Oct 20 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19815525> >.

RODRIGUES, J. Pathotypes and probiotics: response to a commentary on the detection of a Shiga toxin producing Escherichia coli in a Crohn's disease patient. **Gut Pathog**, v. 7, Jul 11 2015. ISSN 1757-4749. Disponível em: < <Go to ISI>://000357718900001 >.

ROLHION, N.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Adherent-invasive Escherichia coli in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 13, n. 10, p. 1277-83, Oct 2007. ISSN 1078-0998 (Print)

1078-0998 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476674> >.

RUTHERFORD, K. et al. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, n. 10, p. 944-5, Oct 2000. ISSN 1367-4803 (Print)

1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120685> >.

SASAKI, M. et al. Invasive Escherichia coli are a feature of Crohn's disease. **Lab Invest**, v. 87, n. 10, p. 1042-54, Oct 2007. ISSN 0023-6837 (Print)

0023-6837 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17660846> >.

SCALDAFERRI, F.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis. **J Dig Dis**, v. 8, n. 4, p. 171-8, Nov 2007. ISSN 1751-2972 (Print)

1751-2972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17970872> >.

SCHIRBEL, A.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. **J Dig Dis**, v. 11, n. 5, p. 266-76, Oct 2010. ISSN 1751-2980 (Electronic)

1751-2972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20883422> >.

SEKSIK, P. et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. **Gut**, v. 52, n. 2, p. 237-42, Feb 2003. ISSN 0017-5749 (Print)

0017-5749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12524406> >.

THOMAZINI, C. M. et al. High prevalence of aggregative adherent Escherichia coli strains in the mucosa-associated microbiota of patients with inflammatory bowel diseases. **Int J Med Microbiol**, v. 301, n. 6, p. 475-9, Aug 2011. ISSN 1618-0607 (Electronic)

1438-4221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21616711> >.

TOUCHON, M. et al. Organised genome dynamics in the Escherichia coli species results in highly diverse adaptive paths. **PLoS Genet**, v. 5, n. 1, p. e1000344, Jan 2009. ISSN 1553-7404 (Electronic)

1553-7390 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19165319> >.

WATANABE, T. et al. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. **Nat Immunol**, v. 5, n. 8, p. 800-8, Aug 2004. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220916> >.

XAVIER, B. B. et al. Complete Genome Sequences of Nitrofurantoin-Sensitive and -Resistant Escherichia coli ST540 and ST2747 Strains. **Genome Announc**, v. 2, n. 2, 2014. ISSN 2169-8287 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24723707> >.

YAN, X. et al. Genome sequencing and comparative genomics provides insights on the evolutionary dynamics and pathogenic potential of different H-serotypes of Shiga toxin-producing Escherichia coli O104. **Bmc Microbiology**, v. 15, p. 83, 2015. ISSN 1471-2180 (Electronic)

1471-2180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25887577> >.

YU, C. G.; HUANG, Q. Recent progress on the role of gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **J Dig Dis**, v. 14, n. 10, p. 513-7, Oct 2013. ISSN 1751-2980 (Electronic)

1751-2972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23848393> >.