

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina

Campus de Botucatu

**Pesquisa de Fatores de Patogenicidade em *Escherichia coli*
Enterogregativas da Microbiota Intestinal de Pacientes com
Doença Inflamatória Intestinal**

Cristiane Melissa Thomazini

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-
UNESP para obtenção do título de Doutor.

Botucatu-SP

2010

Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina

Campus de Botucatu

**Pesquisa de Fatores de Patogenicidade em *Escherichia coli*
Enteroagregativas da Microbiota Intestinal de Pacientes com
Doença Inflamatória Intestinal**

Doutoranda: Cristiane Melissa Thomazini

Orientadora: Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

Co- Orientador: Josias Rodrigues

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-
UNESP para obtenção do título de Doutor.

Botucatu-SP

2010

Thomazini, Cristiane Melissa.

Pesquisa de fatores de patogenicidade em *Escherichia coli* enteroagregativas da microbiota intestinal de pacientes com doença inflamatória intestinal : estudo clínico em humanos / Cristiane Melissa Thomazini.
- Botucatu, 2010

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

Co-orientador: Josias Rodrigues

Capes: 21202010

1. *Escherichia coli* - Doença - Intestinal.

Palavras-chave: Doença, *Escherichia coli*, , Inflamação, Intestinal, Virulência.

Sumário

I.	Introdução e Revisão de Literatura.....	01
II.	Referências.....	15
III.	Objetivos.....	21
IV.	Manuscrito	22
V.	Conclusões	45

I. Introdução e Revisão de Literatura

Processos inflamatórios crônicos de causa não completamente definida provocam lesões ao longo do trato gastrintestinal configurando o quadro patológico referido pela designação genérica *Doença inflamatória intestinal* (DII). Identificada em meados do século XIX e, desde então, objeto de intenso estudo, afeta principalmente indivíduos adultos jovens residentes em regiões desenvolvidas. No Brasil, embora as informações sejam escassas, dados disponíveis indicam aumento de sua incidência (Victoria et al., 2009).

A DII apresenta-se sob duas formas clínicas principais: a retocolite ulcerativa e a doença de Crohn (Hendrickson et. al., 2002). Na retocolite ulcerativa a resposta inflamatória restringe-se ao cólon, sendo o reto afetado em 95% dos casos. As lesões ocorrem superficialmente, de forma contínua e com gravidade variável, na mucosa (Figura 3).

Histologicamente observam-se inflamação crônica e aguda com infiltrado de leucócitos polimorfonucleares e monócitos, abscessos das criptas e distorção das glândulas (Figura 1). Há diarreia, com muco e sangue e dores abdominais de extensão variável.

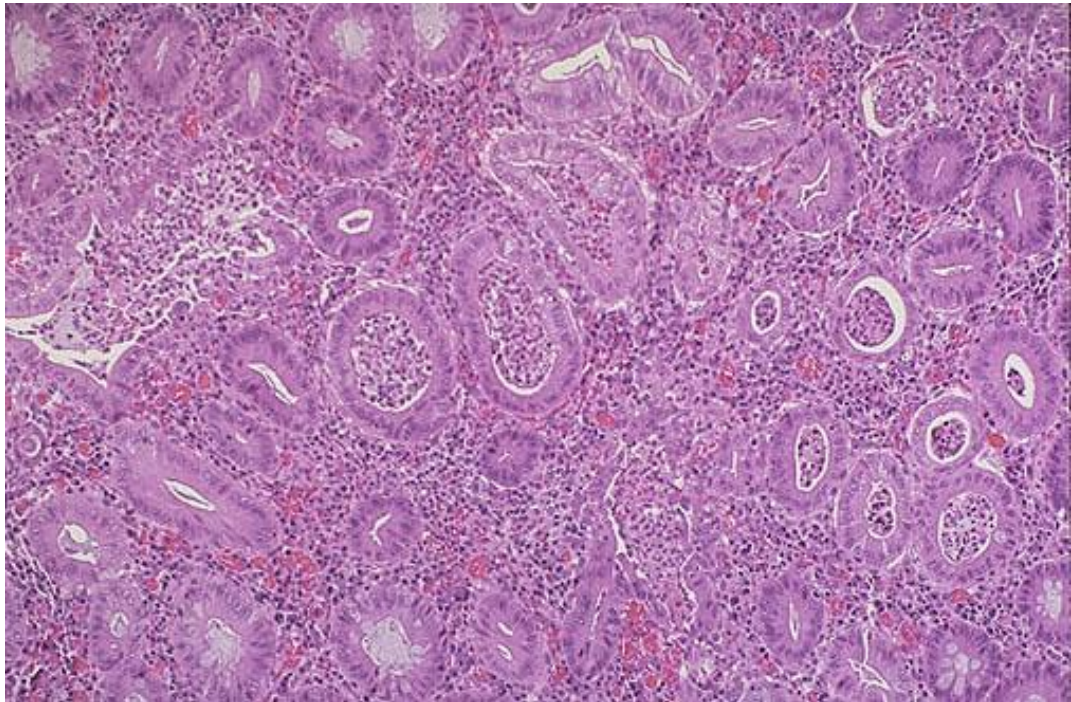


Figura 1. Retocolite Ulcerativa: Microabscessos de cripta

A doença de Crohn pode afetar, de forma descontínua, qualquer parte do trato gastrointestinal, desde a boca até o ânus. A inflamação pode ser profunda, transmural, atingindo a serosa e levando à formação de fístulas (Figura 1). Observam-se pequenas ulcerações superficiais sobre as placas de Peyer e inflamação crônica focal estendendo-se à submucosa. A região ileocecal é a mais atingida. No exame histopatológico, granulomas epitelióides, sem necrose caseosa, são identificados em cerca de metade dos casos (Figura 2). A cicatrização das lesões inflamatórias resulta no estreitamento da luz intestinal e tais “lesões estenosantes” são expressas clinicamente por obstrução intestinal.

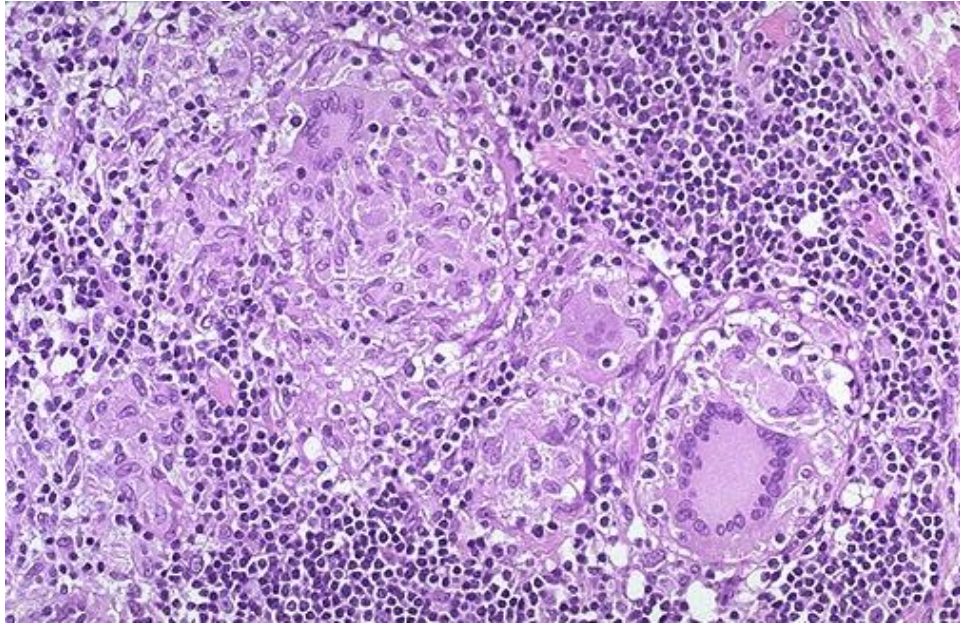


Figura 2. Doença de Crohn: Granulomas Epitelióides.

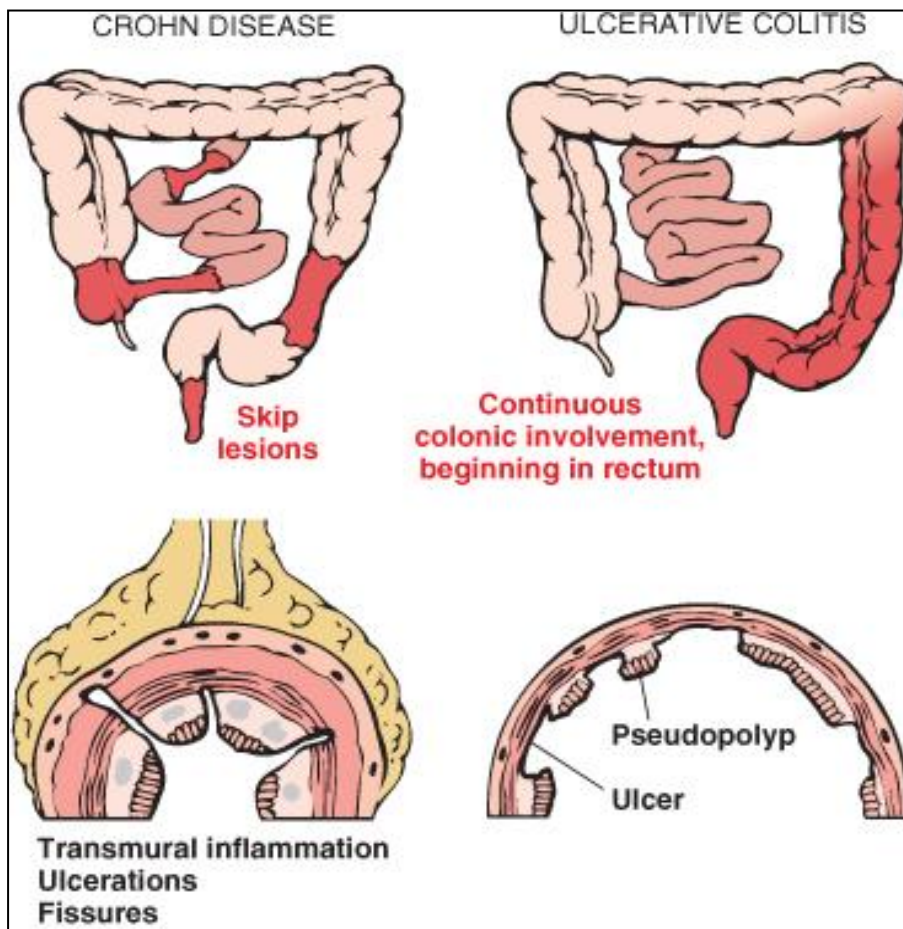


Figura 3. Diferenças entre Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa.

Ao contrário da retocolite ulcerativa, onde a presença de sangue nas fezes significa um alerta, apressando a busca pelo diagnóstico, o reconhecimento da doença de Crohn é mais sutil e tardio. Os sintomas são variáveis e dependem da região acometida. Eventualmente, os sintomas de doença de Crohn colônica podem ser confundidos com retocolite ulcerativa, visto que podem ser acompanhados de dores abdominais e diarreia com sangue e muco. Ambas as formas clínicas podem ser acompanhadas de manifestações extraintestinais, incluindo febre, perda de peso, artrite, lesões muco-cutâneas, complicações oftalmológicas, anomalias hepatobiliares e ósseas e, no caso de crianças, retardo no crescimento e maturidade sexual (Hendrickson et al., 2002). A diarreia intensa e os distúrbios eletrolíticos são complicações graves, potencialmente fatais, assim como o megacólon tóxico. A principal complicação de longa duração é o aumento do risco para câncer, observado principalmente nos pacientes com retocolite ulcerativa (Odze, 2006).

Vários fatores genéticos e ambientais parecem contribuir para a susceptibilidade à DII. Evidências da participação de fatores genéticos são múltiplas como, por exemplo, uma maior predisposição de parentes de portadores acometidos pela doença (Fiocchi, 1998), maior índice de concordância na retocolite ulcerativa entre gêmeos monozigóticos do que dizigóticos (Victoria et. al., 2009) e alterações imunológicas como uma maior frequência de anticorpos contra determinados antígenos em parentes de primeiro grau de portadores de DII (Fiocchi, 1998). Estas constatações motivaram estudos que levaram à identificação de um gene associado à doença de Crohn (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). O produto gênico, a proteína NOD2, é um receptor citossólico para constituintes bacterianos, como o peptidoglicano e o lipopolissacarídeo (LPS). NOD2 é expresso em monócitos e ativa um modulador inflamatório nuclear (NF- κ B), responsável pelo controle da expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 1 e o fator de necrose tumoral (TNF α)

(Ardizzone & Bianchi, 2002). Acredita-se que a mutação em NOD2 resulte na perda do reconhecimento de produtos bacterianos, o que indiretamente deve afetar a capacidade modulatória de NF-kb, levando a uma atividade exacerbada do sistema imune. Entre os fatores ambientais com possível relação com a DII, inclui-se o tabagismo, a dieta e a permeabilidade da mucosa (Fiocchi, 1998). A contribuição de cada um é variável de acordo com a forma clínica. Por exemplo, a condição de fumante favorece uma melhora nos sintomas de retocolite ulcerativa, mas uma piora no quadro clínico da doença de Crohn. Parentes de pacientes com doença de Crohn, mas não os de retocolite ulcerativa, apresentam maior permeabilidade da mucosa intestinal. A dieta parece influenciar os sintomas da doença de Crohn, mas não da retocolite ulcerativa. Além disto, componentes genéticos parecem ser mais relevantes para o surgimento da doença de Crohn do que da retocolite ulcerativa.

A flora bacteriana intestinal parece exercer papel no desencadeamento e/ou na manutenção da DII. O envolvimento da microbiota intestinal tem sido objeto de constante indagação e controvérsia. Experimentos com modelos animais, bem como observações em humanos, têm mostrado possível associação bacteriana com a causa da DII. Indícios neste sentido são abundantes, como o fato de a doença não se desenvolver em animais geneticamente modificados (para sensibilidade à doença) quando criados em condições *germ-free* (MacDonald, 1994.) e a existência, em tecidos de lesão, de uma maior concentração de DNA bacteriano do que em preparações normais da mucosa (Schubert et. al., 1998). Evidências indiretas do papel da microbiota incluem a constatação de que pacientes com doença de Crohn submetidos cirurgicamente a desvio do fluxo fecal apresentam regressão das lesões, as quais ressurgem com o retorno à via normal do fluxo intestinal (Ryan et. al., 2004.). Também, o uso de antibióticos tem sido considerado

alternativa terapêutica para a DII (Podolsky, 2002). Analisando-se a diversidade bacteriana na microbiota intestinal de pacientes com DII, observa-se um desequilíbrio na composição de espécies. Populações de *Clostridium* e *Escherichia coli* (*E. coli*) estão aumentadas, ao passo que de *Bifidobacterium* estão reduzidas (Mylonaki et. al., 2005). Alguns autores acreditam que as reações inflamatórias típicas da DII acontecem em resposta a este desequilíbrio, refletindo uma diminuição na concentração de bactérias protetoras e um aumento das potencialmente patogênicas – um fenômeno conhecido como disbiose (Dexreumax & Colombel, 2003). No entanto, ainda não foi estabelecida de forma clara a associação de um grupo bacteriano em particular, dotado ou não de fatores de patogenicidade, com a causa da doença.

Entre os aeróbios facultativos da microbiota intestinal humana, a *E. coli* é a bactéria predominante, onde exerce inúmeras funções, tais como a produção de vitaminas e a ocupação de espaço, prevenindo o estabelecimento local de organismos patogênicos (Nataro et. al., 1994.). Compreende diversas linhagens sendo, a maioria envolvida na associação comensal com o homem. No entanto há clones naturais com potencial de patogenicidade (Nataro et. al., 1994.).

Como um dos principais membros da microbiota intestinal humana, a *E. coli* tem sido frequentemente investigada quanto a uma possível associação com a causa da DII. Uma série de informações atualmente disponíveis parece sugerir esta ligação. O número destas bactérias é aumentado em portadores da doença – uma observação de diferentes autores, analisando-se tanto populações bacterianas das fezes quanto de biópsias da mucosa intestinal (Rhodes, 2007). Além disto, estes pacientes apresentam anticorpos não só em título maior, mas também contra uma maior diversidade de antígenos O de *E. coli*. (Toma et al., 2003). Em portadores de doença de Crohn e, em menor grau, de retocolite ulcerativa, há uma maior

prevalência de indivíduos com uma resposta humoral intensa contra a porina OmpC de *E. coli* do que em indivíduos-controles (Rutgeerts et al.,1991), tendo sido demonstrada uma associação direta desta resposta com a gravidade da doença de Crohn (Mow et. al., 2004). Não obstante estes achados, o potencial de patogenicidade das *E. coli* de pacientes com DII não é completamente conhecido, sendo motivo constante de controvérsia. Para alguns, a população bacteriana excedente nestes pacientes seria composta apenas por linhagens da microbiota residente, cujo aumento foi facilitado pelo comprometimento de barreiras de defesa inespecíficas como, por exemplo, a maior permeabilidade na mucosa e a quebra de tolerância a antígenos bacterianos observada em portadores de doença de Crohn (Campieri & Gionchetti,2001). Esta hipótese tem por base resultados de alguns estudos em que não se observaram diferenças na prevalência, entre os grupos caso e controle ou em fases distintas da doença, de linhagens portadoras de determinados fatores de patogenicidade, tais como toxinas e adesinas (Giaffer et. al.,1992; Seksik et. al.,2003).

Uma propriedade comumente investigada em *E. coli* de pacientes com DII é a capacidade de adesão e/ou invasão a células epiteliais, em experimentos realizados *in vitro*. Vários trabalhos têm demonstrado uma maior prevalência de linhagens aderentes entre as bactérias dos pacientes com DII do que de controles (Martin et. al,2004; Schumacher et. al, 1995). Embora resultados de diferentes pesquisadores sejam conflitantes, as diferenças parecem se justificar por variações nos métodos empregados. Fatores importantes incluem a linhagem de células utilizadas no teste de adesão das bactérias (Martin et. al, 2004), o tempo de incubação destas com as células hospedeiras (Sasaki et. al, 2007) e os critérios de determinação do número de bactérias aderidas à preparação. Nos primeiros testes descritos, foram empregadas células retiradas da mucosa bucal de voluntários, em ensaios de 30 minutos de contato bactéria-célula. Nestes experimentos, a prevalência de *E. coli* aderentes

em pacientes mostrou-se invariavelmente superior à observada em controles (Burke & Axon 1988; Giaffer et. al,1992). Empregando-se linhagens de células HEp-2 (originárias de carcinoma de laringe), em testes de 6h, Schultsz et al (1997), não encontraram diferenças na prevalência de bactérias aderentes entre os grupos. No entanto, em testes de 3h feitos com estas mesmas células, observa-se um predomínio de linhagens aderentes em pacientes (Sasaki et. al., 2007). Aparentemente, linhagens de *E. coli* aderentes em 3h são geneticamente distintas daquelas que requerem o tempo de 6h. Estas devem ser geneticamente mais relacionadas a linhagens não aderentes (Sasaki et. al.,2007) e, tendo em vista a sua igual prevalência em casos e controles, deve apresentar pouco ou nenhuma relação com os sintomas da DII.

Em testes com linhagens celulares originárias tanto do intestino grosso (caco-2) como do intestino delgado (*Intestine407*), em ensaios de 3h, Darfeuille-Michaud et al (1998) observaram uma maior prevalência de *E. coli* aderentes em pacientes com doença de Crohn. A capacidade de adesão a células eucarióticas em testes *in vitro* é comum entre patotipos clássicos de *E. coli* diarreio gênicas (Nataro et. al., 1994). Apesar de as linhagens bacterianas isoladas de casos de DII compartilharem esta propriedade com estes patotipos, não apresentam os genes das adesinas e outros fatores de virulência correspondentes (Darfeuille-Michaud et. al., 1998, Kotlowski et. al., 2007.), o que sugere que a interação celular possivelmente acontece através de mecanismos distintos. Os pacientes com doença de Crohn, em particular, apresentam uma maior prevalência de linhagens capazes de invadir células caco-2 (Schubert et. al., 1998). Estudos detalhados de uma destas linhagens revelaram ausência de fatores de virulência clássicos e mecanismo de invasibilidade distinto de *E. coli* enteroinvasora (EIEC),cujo modo de associação e entrada em células eucarióticas é bem conhecido(Nataro & Kaper, 1998.). Diferentemente do que se observa para EIEC e

outras categorias de *E. coli* que parasitam células eucarióticas, a internalização é dependente de microtúbulos (Boudeau et. al., 1999). As *E. coli* invasoras encontradas em portadores de doença de Crohn são capazes de replicar no interior de células epiteliais intestinais e macrófagos e, nestes, induzem a produção de TNF- α (Darfeuille-Michaud et. al., 2004). Estas diferenças justificaram o seu reconhecimento como uma nova categoria patogênica, referida como “adherent-invasive” *E. coli* (AIEC). Além das particularidades acima, o papel de vários fatores no processo de interação celular de AIEC tem sido identificado. Por exemplo, a entrada nas células-alvo é dependente de fímbrias do tipo 1 (Boudeau et. al., 2001.) e a regulação da expressão de fatores de virulência se dá à custa de porinas OmpC e de flagelos (Rutgeerts et. al., 1991.). Além disto, estas bactérias são capazes de induzir a formação de granulomas (Meconi et. al., 2007). Conforme mencionado, as características de AIEC são distintas das de EIEC e resumem-se a três propriedades (Rhodes, 2007): a) adesão e invasão de células epiteliais de origem intestinal em ensaios *in vitro*, através de mecanismo semelhante à macropinocitose e dependente da ação de microfilamentos e microtúbulos, b) multiplicação no interior de macrófagos, sem matar estas células e c) indução da secreção de grande quantidade de TNF- α pelos macrófagos infectados. As AIEC têm sido comumente encontradas em lesões recorrentes do íleo de pacientes com doença de Crohn submetidos à cirurgia (Darfeuille-Michaud et. al., 2004.), sugerindo possível ligação com sua causa.

Com base nas informações disponíveis, acredita-se que a participação da *E. coli* na patogênese da doença de Crohn consiste na ligação a receptores alterados, colonização e invasão dos enterócitos, ou penetração da mucosa via células M. Na lâmina-própria, ocorre a fagocitose por macrófagos e células dendríticas, replicação intracelular e ativação contínua destas células. A ativação de macrófagos e células dendríticas faz com que estas células produzam TNF- α que estimula a liberação de interleucina-8 (IL-8) pelos enterócitos e o

recrutamento de leucócitos polimorfonucleares para a região basal e superfície da mucosa (Darfeuille-Michaud, 2002), onde contribuem para o processo inflamatório. A formação de granulomas ocorre pela persistência das bactérias nos macrófagos, devido ao comprometimento dos mecanismos de defesa intracelulares resultante da mutação em NOD2/CARD5, identificada em portadores da doença (Martin et. al., 2004). Pelo menos no caso da doença de Crohn, além dos fatores já expostos, diferenças quanto ao tipo de material clínico, parecem explicar as divergências sobre a participação da *E. coli* na DII. Normalmente, os testes têm sido feitos a partir de cultura de fezes ou de biópsias (de tecido normal ou de lesões). Acredita-se que as linhagens possivelmente patogênicas estejam na mucosa e não no lúmen intestinal (Rhodes, 2007). A concentração de *E. coli* intracelulares (Martin et. al., 2004) e aderidas (Kotlowski et. al., 2007) na superfície de biópsias do cólon de pacientes com doença de Crohn é superior à observada no mesmo material de indivíduos controle. A diferença em favor dos pacientes é maior quando se retira o muco do tecido (Martin et. al., 2004). Estas *E. coli* destacam-se pela capacidade de aglutinar eritrócitos humanos, uma propriedade que se correlaciona com a capacidade de adesão e invasão celular (Martin et. al., 2004). Acredita-se que a adesão bacteriana seja mediada pela ligação de fímbrias a glicoproteínas ou glicolipídeos anômalos expressos pelas células epiteliais da mucosa – uma observação que tem apoiado a proposta da utilização de fibras solúveis como bloqueadores da adesão bacteriana como forma de controle dos sintomas da doença (Martin et. al., 2004).

Conforme mencionado, o modelo sugerido de participação da *E. coli* na patogênese da doença de Crohn é o de uma categoria invasora, dada as propriedades das cepas isoladas dos casos estudados e as características da doença – reações inflamatórias localizadas, formação de granulomas e eventualmente de fístulas. O crescente volume de informações

sobre os fatores de virulência de AIEC parece confirmar esta hipótese (Rutgeerts et. al., 1991). Embora o conhecimento sobre o papel de *E. coli* na retocolite ulcerativa seja menor, a possível participação destas bactérias parece se dar por um mecanismo distinto, não relacionado à invasão. Conforme o modelo proposto por Rhodes (Rolhion & Darfeuille-Michaud, 2007), as bactérias interagem com as células epiteliais da mucosa através dos receptores *toll-like 5* (TLR-5), estimulando a liberação de interleucinas pró-inflamatórias como a IL-8, as quais seriam responsáveis pela ativação e recrutamento de neutrófilos, desencadeando as reações inflamatórias locais. Este modelo é compatível com a distribuição contínua e de intensidade menor das lesões observadas nesta variante clínica da DII. A associação de *E. coli* com as células epiteliais acontece através de diferentes estruturas bacterianas e classes de TLRs e NOD2/CARD5 presentes nestas células (Cario, 2005). Grande parte destas estruturas, que inclui LPS, peptidoglicano, flagelina e fímbrias do tipo 1 está presente em linhagens da microbiota residente e linhagens patogênicas. Outras características como a capacidade de adesão a modelos celulares, são compartilhadas por linhagens patogênicas e comensais. Todavia, bactérias aderentes e potencialmente patogênicas podem ser distinguidas pelo fenótipo de adesão que expressam: Agregativo, De adesão difusa e Localizado (Nataro & Kaper, 1998). Por exemplo, o fenótipo agregativo é expresso por uma das categorias diarreioagênicas mais estudadas atualmente – a *E. coli* enteroagregativa (EAEC). A maioria das linhagens isoladas da mucosa do cólon de pacientes com DII apresenta o fenótipo agregativo (Sasaki et. al., 2007.) sugerindo possível envolvimento de EAEC com a DII. Outras evidências parecem sustentar esta hipótese. Entre estas, inclui-se o fato de esta categoria induzir a expressão de IL-8 – uma citocina próinflamatória – pelas células da mucosa intestinal (Jiang et. al., 2002). Amostras expressando o padrão agregativo são também comuns em casos de infecções urinárias. Recentemente, foi demonstrado que linhagens de *E. coli* uropatogênicas são geneticamente

relacionadas à EAEC (Wallace-Gadsden et. al., 2007). A ausência de fatores de virulência típicos de *E. coli* diarreio gênicas em linhagens isoladas de casos de DII tem levado alguns autores a inferir que elas pertencem a categorias associadas a infecções extraintestinais. Na verdade, análise filogenética comparando-se estas linhagens com cepas de referência de *E. coli* (coleção ECOR), revela que as mesmas situam-se em grupos clonais representados por patotipos de infecções extraintestinais (Kotlowski et. al., 2007).

A maioria dos dados sobre o papel da microbiota intestinal na etiopatogênese da DII é relacionada a bactérias cultiváveis. Todavia, sabe-se que em torno de 80% dos milhares de espécies presentes no intestino não são cultiváveis e, por isto, pouco conhecidos (Eckburg et. al., 2005). Estudos quantitativos, baseados na análise genética, por métodos independentes de cultivo, têm mostrado que estas bactérias também estão aumentadas em pacientes com DII (Souza et. al., 2002). Inúmeras funções têm sido atribuídas à microbiota intestinal e sua influência na homeostase intestinal tem sido amplamente reconhecida. Assim, não são surpreendentes as conclusões de muitos estudos até então realizados relacionando-a como um dos fatores determinantes da causa da DII.

A despeito dos inúmeros estudos, as informações disponíveis na literatura não são claras quanto ao potencial de virulência das linhagens de *E. coli* isoladas nos casos de DII. Além dos ensaios quantitativos que comparam a microbiota de pacientes em diferentes estágios da doença com a de indivíduos-controles, as abordagens investigativas tem se concentrado na pesquisa de marcadores de virulência típicos das categorias diarreio gênicas conhecidas. A maioria dos estudos foi conduzidos com amostras bacterianas de pacientes portadores de doença de Crohn. Os resultados dos estudos indicam ausência de fatores de virulência dos patotipos diarreio gênicos tradicionais, inclusive dos marcadores genéticos envolvidos nos processos de interação com células do hospedeiro (Cooke et al., 1974; Giaffer et. al.,1992).

No Brasil, são escassas as informações quanto à prevalência da DII, bem como de suas possíveis correlações com fatores etiológicos, microbiológicos ou terapêuticos (Dichi et. al., 1998; Dichi et. al. 2000; Barbosa et.al.,2003).

Desta forma, a presente investigação visa contribuir para o esclarecimento da possível participação das *E. coli* da microflora associada à mucosa intestinal na patogênese da DII.

II. Referências Bibliográficas

1. **Ardizzone, S., and G. P. Bianchi.** 2002. Inflammatory bowel disease: insights into pathogenesis and treatment. *J. Int. Med.* **256**:475-496.
2. **Barbosa DS, Cecchini R, El Kadri MZ, et. al.** 2003. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids. *Nutrition.* Oct;19(10):837-42.
2. **Boudeau, J., N. Barnich, and A. Darfeuille-Michaud.** 2001. Type 1 pilimmediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolate from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **39**:1272-1284.
3. **Boudeau, J., A. L. Glasser, E. Masseret, et al.** 1999. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* **67**:4499-4509.
4. **Burke, D. A., and A. T. R. Axon.** 1988. Adhesive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea. *BMJ.* **297**:102-104.
5. **Campieri, M., and P. Gionchetti.** 2001. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut.* **48**:132-135.
6. **Cario, E.** 2005. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll like receptors and NOD2. *Gut.* **54**:1182-1193.
7. **Cooke EM, Ewins SP, Hywel-Jones J, Lennard-Jones JE.** 1974. Properties of strains of *Escherichia coli* carried in different phases of ulcerative colitis. *Gut.* Feb;15(2):143-6.

8. **Darfeuille-Michaud, A.** 2002. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**:185-193.
9. **Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, P. Bulois, et al.** 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology.* **127**:412-421.
10. **Darfeuille-Michaud, A., C. Neut, N. Barnich, et al.** 1998. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* **115**:1405-1413.
11. **Dexreumax, P., and J. Colombel.** 2003. Intestinal flora and Crohn's disease. *Ann. Pharm. Fr.* **61**:276-281.
12. **Dichi I, Dichi JB, Frenhane P, et. al.** 1998. Use of proteic metabolism (15N-glycine) in the early detection of disease exacerbation in patients with non-specific ulcerative colitis. *Arq.Gastroenterol.* Jul-Sep;35(3):175-80.
13. **Dichi I, Frenhane P, Dichi JB, Correa CR, Angeleli AY, Bicudo MH, et. al.** 2000. Comparison of omega-3 fatty acids and sulfasalazine in ulcerative colitis. *Nutrition.* Feb;16(2):87-90.
14. **Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, et al.** 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora.(Reports). *Science.* **308**:1635-1638.
15. **Fiocchi, C.** 1998. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology.* **115**:182-205.
16. **Giaffer, M. H., C. D. Holdsworth, and B. I. Duerden.** 1992. Virulence properties of *Escherichia coli* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* **33**:646-650.

17. **Hendrickson, B. A., R. Gokhale, and J. H. Cho.** 2002. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:79-94.
18. **Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, et al.** 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* **411**:599-603.
19. **Jiang, Z. D., D. Greenberg, J. P. Nataro, et al.** 2002. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4185-4190.
20. **Kotlowski, R., C. N. Bernstein, S. Sepehri, et al.** 2007. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut.* **56**:669-675.
21. **MacDonald, T. T.** 1994. Inflammatory bowel disease in knockout mice. *Curr.Biol.* **4**:261-263.
22. **Martin, H. M., B. J. Campbell, C. A. Hart, et al.** 2004. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology.* **127**:80-93.
23. **Meconi, S., A. Vercellone, F. Leveillain, et al.** 2007. Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas *in vitro*. *Cel. Microbiol.* **9**:1252-1261.
24. **Mow, W. S., E. A. Vasilias, Y.-C. Lin, et al.** 2004. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology.* **126**:414-424.
25. **Mylonaki, M., N. B. Rayment, D. S. Rampton, et al.** 2005. Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **11**:481-487.

26. **Nataro, J. P., Y. Deng, and K. Walker.** 1994. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence factor I expression. *J. Bacteriology*. **176**:4691- 4699.
27. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**(1):142-201.
28. **Odze R.D.** 2006. Pathology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* **35**: 533-52.
29. **Ogura, Y., D. K. Bonen, N. Inohara, et al.** 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. **411**:603-606.
30. **Podolsky, D. K.** 2002. Medical progress: Inflammatory bowel disease. *New Engl. J. Med.* **347**:417-429.
31. **Rhodes, J. M.** 2007. The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. **56**:610-612.
32. **Rolhion, N., and A. Darfeuille-Michaud.** 2007. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**:1277- 1283.
33. **Rutgeerts, P., M. Peeters, M. Hiele, et al.** 1991. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet*. **338**:771-774.
34. **Ryan, P., R. G. Kelly, G. Lee, et al.** 2004. Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease--detection by laser capture microdissection and PCR. *Am. J. Gastroenterol.* **99**:1539-1543.
35. **Sasaki, M., S. V. Sitaraman, B. A. Babbitt, et al.** 2007. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Labor. Invest.* **10**:1-13.

36. **Schubert, S., A. Rakin, H. Karch, et al.** 1998. Prevalence of the "High- Pathogenicity Island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect. Immun.* **66**:480-485.
37. **Schultsz, C., M. Moussa, R. van Ketel, et al.** 1997. Frequency of pathogenic and enteroadherent *Escherichia coli* in patients with inflammatory bowel disease and controls. *J. Clin. Pathol.* **50**:573-579.
38. **Schumacher, G., H. Steinruck, A. Geyid, et al.** 1995. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from the rectal mucosa of patients with first attacks of colitis. *Microb. Ecol. Health Dis.* **8**:1-7.
39. **Seksik, P., L. Rigottier-Gois, G. Gramet, et al.** 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut.* **52**:237-242.
40. **Souza, M. H. L. P., L. E. A. Troncon, C. M. Rodrigues, et al.** 2002. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e retocolite ulcerativa idiopáticas e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. *Arq. Gastroenterol.* **39**:98-105.
41. **Toma, C., Y. Lu, N. Higa, et al.** 2003. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2669-2671.
42. **Victoria, C. R., Sassak, L.Y. et.al.** 2009. Incidência e prevalência das doenças inflamatórias intestinais na região centro-oeste do Estado de São Paulo. *Arq. Gastroenterol.* [online]. **46**: 20-25.
43. **Wallace-Gadsden, F., J. R. Johnson, J. Wain, et al.** 2007. Enteroaggregative *Escherichia coli* related to uropathogenic clonal group A. *Emerg. Infect. Dis.* **13**:757-760.

III. Objetivos

Considerando a importância dos fatores microbianos na patogênese da doença inflamatória intestinal, o presente estudo foi desenvolvido com objetivo de:

1 - Avaliar a frequência de fatores patogênicos nas *Escherichia coli* da microflora associada à mucosa intestinal, obtidas de pacientes com doença inflamatória intestinal e de seus respectivos controles.

2- Caracterizar as amostras de *E. coli* isoladas por sorotipagem e tipagem molecular por “Enterobacterial repetitive Intergenic consensus” (ERIC-PCR)

3- Pesquisar nas amostras de *E. coli* isoladas a presença dos seguintes genes de virulência: *eae*, *ial*, *ipaH*, *aggR* e *pAA*, por PCR multiplex.

4 – Investigar a patogenicidade das amostras de *E. coli* isoladas pelo teste de adesão em células HEp-2.

IV. Manuscrito

High Prevalence of Enteroaggregative *Escherichia coli* strains in Patients with Inflammatory Bowel Disease

Short title: High prevalence of EAEC among IBD patients

Thomazini, C. M.^{1,4}; Rodrigues, M.A.M.⁴, Samegima, D. A. G.^{1,3} Victoria, C. R.²; and Rodrigues, J.^{1*}

¹ Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP em Botucatu, SP Brazil;

² Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UNESP, em Botucatu, SP Brazil;

³ Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP em São Paulo SP Brazil;

⁴ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, em Botucatu; SP Brazil;

* *Corresponding author*: Cristiane Melissa Thomazini, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências da UNESP em Botucatu, CEP 18618-000, Botucatu, SP Brazil. Email address: cristhomazini@uol.com.br

Abstract

Intestinal population of *Escherichia coli* is increased in patients suffering from inflammatory bowel disease (IBD), but the reason for this elevation and particular features of these bacteria are not fully known. In this study, the adherence abilities and phenotypes of a collection of 131 *E. coli* isolates cultured from rectal biopsies of 27 subjects diagnosed with ulcerative colitis (UC), 8 with Crohn's disease (CD) and 19 control patients were investigated, using HEp-2 cells in assays of 3 and 6h of bacteria-cell contact. The isolates were also PCR screened for the presence of markers linked to adherence and invasion: plasmid of aggregative adhesion (pAA) and the aggregative adherence fimbriae R (*aggR*), *E. coli* attaching and effacing (*eae*), invasion-associated locus (*ial*) and invasion plasmid antigen H (*ipaH*) genes. Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) strains, as detected in 3h adherence assays, were found in 25/35 (71.4%) IBD patients and in 5/19 (26.3%) controls ($P < 0.02$). None of the strains had *ial* or *ipaH*, and those from CD patients were also negative for other investigated markers. Three UC patients had strains harboring both pAA and *aggR* and another 4 UC patients had *eae*⁺ strains. The results of the present study showed that EAEC were the dominant *E. coli* group found in the colonic mucosa of IBD patients. In addition, the detection of virulence markers in strains from 7/27 UC (25.9%), but in none from CD patients ($p < 0.02$) suggests the involvement of known potentially pathogenic (typical) EAEC with ulcerative colitis.

Introduction

Intestinal microbiota plays a central role in modulating the immune system, which in turn affects its development. Disturbances in this interplay have profound effects on the normal physiology of the intestinal tract, eventually leading to pathological conditions. For example, the lesions observed in the intestinal mucosa of patients suffering from inflammatory bowel disease (IBD) are products of local inflammatory reactions resulting from an exacerbated immune response [14]. IBD manifests in two main clinical variants, which besides other features, differ by the sites where the inflammatory reactions take place. In ulcerative colitis (UC), they are restricted to the gut, particularly the distal colon, whereas in Crohn's disease (CD), although more frequent at this site, may affect other parts of the digestive tube and even extra-intestinal tissues. Changes in the composition of intestinal microbiota, with an increase of some bacterial groups, usually facultative aerobes and reduction of some strict anaerobes and microaerophiles are common observations in IBD patients [29]. It is not clear whether the altered microbiota is a consequence of the anomalous immune response or a stimulus that triggers it, but evidence such as the concurrent distribution and severity of the ulcerations and the sites of higher bacterial concentration [25] are at least suggestive of some role played by bacteria in IBD pathogenesis.

As a dominant facultative aerobe of the colon, *Escherichia coli* has been a natural focus of investigation in the search for an infectious component in the etiology of IBD. Some studies have demonstrated a quantitative rise in the population of these bacteria in the stools and intestinal mucosa of IBD patients [21,18,7]. *E. coli* has been also shown to stimulate humoral and cellular immune responses. IBD patients have agglutinating

antibodies in high titers and to a high number of *E. coli* O antigens [31]. Peripheral anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, which are autoantibodies resulting from the abnormal immune response and used as specific seromarkers for the diagnosis of IBD, cross-react with an *E. coli* OmpC porine [4]. Along with other members of intestinal microbiota such as *Bifidobacterium* and *Bacteroides*, *E. coli* has been shown to stimulate the proliferation of specific T cell clones [9]. Although these strains usually do not present classical *E. coli* pathogenicity markers [18], some studies have shown that they have a significant ability to interact with cultured epithelial cells [13,8]. In vitro epithelial cell invasiveness has been considered as a distinctive marker of *E. coli* from CD patients [26]. Boudeau et al [2] fully characterized one invasive *E. coli* strain isolated from the ileal mucosa of these patients, and since it presented no genetic determinants of classical enteroinvasive *E. coli* (EIEC), it was recognized as a new *E. coli* pathotype referred to as adherent-invasive *E. coli* (AIEC) [6, 17]. Both CD and UC clinical isolates seem also to be distinguished by the capacity to superficially adhere to different eukaryotic cells lineages. However methodological variations, including differences in the period of bacterial contact with the cells, the clinical material investigated and the type of cell lineage employed have been ascribed for the conflicting results. In the present study, we have used HEP-2 cells to analyze the adherence properties of mucosa-associated *E. coli* strains from IBD patients. The strains were also screened for the presence of some genetic virulence markers linked to invasiveness and adherence, and typed by enterobacterial intergenic consensus (ERIC) PCR.

METHODS

Patients. The population studied comprised of 54 adult individuals who attended the Gastroenterology unit of the São Paulo State University Hospital, for routine colonoscopy. Thirty-five (16 males and 19 females) individuals were diagnosed with IBD, in different stages of activity (moderate or intense), Being 8 with CD and 27 with UC. The remaining 19 individuals (8 males and 11 females) were non-diarrheic patients and comprised the control group. The IBD patients had ages ranging from 20 to 77 years and the controls 38 to 82. Except for sulphasalazine, regularly administered to IBD patients, no other drugs had been given to the subjects included in the study. All the procedures involving the patients followed the guidelines of the local Committee on Ethics. After being informed about the purpose of the study, each individual was asked to sign a form expressing full consent in submitting to biopsy collection for analysis.

Biopsies collection and *E. coli* isolation. A number of two-to-three tissue fragments, ca. 3 mm, were taken from distinct areas of the colonic mucosa of each individual, dispensed in a 3 ml of sterile alkaline peptone water and kept at 4°C for no more than 2 hours before bacteriological procedures. The biopsies were directly streaked on MacConkey agar plates, which were incubated at 37 °C for 18-24h. Afterwards, a number of 3 to 5 distinct colonies were picked from the plates and submitted to biochemical identification, following conventional procedures. Colonies identified as *E. coli* were grown overnight in tryptic soy broth at 37 °C and the cultures stocked at -70 °C with 15% glycerol.

Adhesion assays. Bacterial adhesion ability was tested in HEp-2 epithelial cells monolayers grown to semi-confluence on spherical coverslips put in 24 wells microplates (Nalge Nunc, Rochester NY, USA), as previously described by Cravioto et al [5]. Briefly, 20 µl of an overnight bacterial culture were added to the cell monolayers and incubated for 3h at 37°C in Eagle's minimal essential medium (Sigma, St Louis, MO, USA) with 2% D-manose and supplemented with 10% fetal calf serum. After incubation, the monolayers were rinsed in PBS, fixed in methanol and stained in May Grünwald and Giemsa. The coverslips were then mounted on microscope slides and observed for the presence of HEp-2 cells attached bacteria. Isolates unable to adhere in a 3h-incubation period were again tested under the same conditions for a 6h period.

Virulence genetic markers detection. The *E. coli* isolates were PCR screened for the presence of the CVD432 genetic probe sequence of the plasmid of aggregative adhesion (pAA); the transcriptional activator (*aggR*) gene of aggregative adhesion fimbriae (AAF/I), the intimin encoding *E. coli* attaching and effacing (*eae*), the invasion associated locus (*ial*), and the invasion plasmid antigen (*ipaH*) genes. Template DNA for the PCR was obtained in crude lysates prepared by boiling bacterial suspensions in distilled water for 10 min, and immediately placing them in ice bath. The reaction mixture, in a total volume of 50µl, consisted of 10x reaction buffer, 0.15 mM MgCl₂, 0,2mM of dNTP mix, 0,2 mM each of forward and reverse primers, 1,25U *Taq* DNA polymerase (Promega) and 5 µl of bacterial lysates. Table 1 shows the primers, DNA target sequences and amplification conditions. The reactions were run in a MJ research thermocycler and PCR products were submitted to electrophoresis in 1% agarose gels,

which were then immersed in 0,5 µg/ml ethidium bromide solution, washed in tap water and observed in a UV transilluminator-coupled image capturer device, with the help of the alpha ease software (Alpha Innotech Corporation).

E. coli K12 HB101 was used as a negative control in all PCR reactions and strains 17-2, O42, E2348/69, and a typical enteroinvasive *E. coli* of our collection were used as positive controls for pAA, *aggR*, *eae*, and *ial/ipaH*, respectively.

ERIC-PCR. The analyses of similarity or divergence among the isolates were performed by comparison of DNA fingerprints generated by enterobacterial intergenic repetitive consensus (ERIC) PCR with modifications introduced by Johnson & O'Bryan [16]. These consisted in the use of a single primer (ERIC2, 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') and in changing the amplification conditions by incorporating elevated annealing temperatures with a 10-cycle, 5°C touchdown (TD) routine. The preliminary denaturation step was for 2 min at 94°C. The TD routine included denaturation for 30 s at 94°C, ramping at 1.5°C/s to the TD annealing temperature (which for the first cycle was set as 5°C above the plateau annealing temperature and then in subsequent cycles was decreased by 0.5°C/cycle until the plateau annealing temperature was reached), annealing for 1 min, ramping at 0.1°C/s to 72°C (extension temperature), and extension for 4.5 min at 72°C. The plateau portion consisted of 25 cycles of denaturation for 30 s at 94°C, ramping at 1.5°C/s to the plateau annealing temperature, annealing for 1 min, ramping at 0.1°C/s to 72°C, and extension for 4.5 min at 72°C, with a final extension step of 1 min at 72°C. Amplifications were done in a 25 µl volume mixture consisting of 10x reaction buffer, 50 pmol ERIC2, 5 mM MgCl₂, 1.25 mM dNTPs mix, 2 U *Taq* DNA polymerase and 2,5 ul bacterial

lysates. Thermocycler, electrophoreses and observation of amplified DNA were as above described. Cluster analyses were conducted using MEGA software [19] based on a distance matrix constructed by pair-wise comparison of amplified DNA band profiles.

Statistical analysis. Differences between groups were calculated by using the χ^2 test. Throughout, the statistical threshold for statistical significance was a P value of < 0.05 .

RESULTS AND DISCUSSION

A number of ninety-five bacterial colonies from the thirty-five IBD patients and of thirty-six from the nineteen controls were identified as *E. coli*. Thus, a higher average number of *E. coli* per subject was detected among the IBD patients, compared to that found in the control group (2.71x1.89, $P < 0.001$). In most cases, isolates from a single patient had an identical ERIC-PCR fingerprint, indicating that they could be multiple isolates a single strain. In one example out of this pattern, five isolates from the same subject were resolved in two distinct fingerprints and, conversely, in two cases, isolates from two distinct patients had identical fingerprints. Apart from these exceptions, multiple isolates from a single patient had an identical fingerprint and thus corresponded to a single and particular strain. Hence, the bulk of 131 isolates was represented by 53 *E. coli* strains being 34 in the IBD and 19 in the control group. No particular clone or clonal group, as defined by ERIC-PCR, could be associated with IBD in any of its clinical variants.

Adherence of the bacteria was tested in a 3h assay and those unable to attach within this period were re-tested at the same conditions for 6h. Regardless the incubation time necessary for their attachment to the cells, adherent strains were found in both groups of

patients. Although a higher prevalence of individuals harboring these strains were found among IBD patients (85.7x63.2% in controls), the observed difference proved not to be statistically significant. Yet, when the time of incubation was considered, the prevalence of individuals harboring 3h adherent strains among IBD patients was *ca.* two-fold as high as that found among controls (83x42%, respectively, P=0.01) and with a higher proportion of aggregative adherent (AA) strains (71.4x26.3 in controls, P<0.02) (fig 1a and table 2). On the other hand, non-adherent (NA), diffusely adherent (DA) within 3 and 6 h (fig 1b) and aggregative adherent strains within 6h incubation (AA6) were common among the subjects of the control group (table 2). No of the virulence genetic markers searched for were detected among the strains from controls, but three individuals among the thirty-five IBD patients had strains harboring both pAA and *aggR* and another four had isolates possessing *ea*e.

Few or no doubt remains about the participation of infectious agents in the cause or complication of the symptoms of IBD [1]. In patients with IBD, intestinal microbiota shows a significant alteration, including a rise in *E. coli* number [24]. Nevertheless, most of the studies have not revealed specific pathogenic strains among this bacterial population [13,18]. In vitro invasive and adherence ability to epithelial cells have been considered differential features of these bacteria, but contrasting observations have been reported [28,3]. Could be related to methodological variations, including the incubation time for bacteria-epithelial cell contact and the fact that some indigenous non-pathogenic *E. coli* strains can also attach to these cells. Usually, the adherence assays are performed using 3 or 6 h incubation time, but the longer period test does not seem reveal difference between IBD and control patients regarding the prevalence of adherent

E. coli strains [28]. In the present study, all strains were first submitted to the 3 h assay and those non-adherent within this period were then tested for 6h. Hence, two groups of time-dependent adherent *E. coli* strains could be defined. Those attaching to cells within the shorter incubation period were detected among IBD patients in prevalence two-fold as high as that found in the control group and comprised mostly of AA+ strains.

To understand the relationship among strains expressing distinct adherence abilities and phenotypes within both tested incubation periods, a group of 10 representatives of the total studied was randomly chosen for genetic cluster analysis. Based on the ERIC-PCR results, the dendrogram shown on figure 2 was constructed using the MEGA software [19]. Regardless of the group of patients they belong to, NA strains tended to cluster with those adherent ones that required the longer incubation time to attach to the cells (AA6 or DA6), but only distantly to the AA strains able to attach to them within 3h (AA3). The close genetic relationship between AA6 and NA strains along with their low prevalence among IBD patients might suggest that they have no involvement with the disease, as opposed to AA3 strains, which were dominant in both UC and CD patients. Among eight subjects of the CD group, only one harbored NA strains; the remaining ones had AA3.

At least some CD strains appear to have different virulence properties from those of UC and this seems to be related to the particular clinical signs of the disease. Fistula and abscesses formation, typical signs of CD, are more compatible with an invasive candidate pathotype [24]. In the survey by Darfeuille-Michaud and colleagues [7], whilst AIEC were found in ileal and colonic mucosa of CD patients, they were absent in

the corresponding site of those with UC. The strains of the present study were not tested for invasiveness, but the observed negative results in the PCR test for *ial* and *ipaH*, typical markers of EIEC [22], rules out the possibility of their, but not of AIEC existence among the CD patients investigated. Then, our PCR results point to a similar conclusion of previous investigations, according to which CD patients do not harbor traditional intestinal pathogenic *E. coli* [8, 18].

Yet among UC patients, a number of seven of twenty-seven (25.9%, $p < 0.02$), had strains harboring classical genetic markers *eae* or *aggR/pAA* of diarrheagenic *E. coli*. All of these strains were HEp-2 cell adherent and with a single exception, expressed the AA phenotype in a 3h assay. The *eae* codes for intimin, a 94 kDa outer membrane protein involved in the intimate bacterial association with the host cell, via a translocated receptor produced by the bacterium itself [17]. Intimin is a key element for the bacteria-induced cytoskeletal modification of the host cell, resulting in the histopathological lesions known as attaching and effacing, triggered by enterohaemorrhagic (EHEC), enteropathogenic (EPEC) and possibly other emerging *E. coli* pathotypes. EPEC, an agent of infantile diarrhea in some developing regions, colonizes the ileal mucosa of susceptible hosts but EHEC, a food borne pathogen, establishes in the large bowel causing hemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome [17], a harmful complication of the enteric infection. Besides attaching and effacing induction, EHEC secrete Shiga cytotoxins (Stx), considered determinants of haemolytic uremic syndrome and aggravating factor for the symptoms of hemorrhagic colitis [22]. Their site of infection and other aspects of EHEC pathogenic effects have prompted a search for *stx+* [18] or Stx producing *E. coli* strains [13] among IBD

patients. Although the involvement of Stx+ *E. coli* with UC has been reported [10], a null or non-significant prevalence of these strains has been observed in case-control studies [13].

An early diagnostic and cryptic marker for enteroaggregative *E. coli* (EAEC), pAA carries multiple virulence genetic determinants and *aggR* is a transcriptional activator of several virulence genes. Kaper and colleagues [17] have proposed the term typical EAEC for strains carrying *aggR* and corresponding regulated genes. Additional virulence factors of EAEC include Pic, a protease toxin with mucinase activity, Pet, an enterotoxin, with the potential to affect host cell cytoskeleton and EAST-1, a peptide-toxin belonging to enterotoxigenic *E. coli* heat stable enterotoxin family [17]. At least some of these factors might contribute for EAEC pathogenesis, which though not fully known depends on bacterial attachment to the intestinal mucus and subsequent biofilm formation. Mucus abundance, particularly in colonic mucosa could represent a favorable niche for proliferation of EAEC in a condition of altered intestinal physiology such as in IBD [23]. The ease with which *E. coli* multiplies in the colon of IBD patients is illustrated in experiments of mucus removal before submitting IBD biopsies to bacterial cultures. Whilst no growth is observed in mucus-free control biopsies, over fifty-percent of facultative aerobic bacteria cultured from CD biopsies under the same treatment are *E. coli* [20]. It has also been shown that EAEC induce interleukin-8 (IL-8) intestinal release [15, 30]. This cytokine is a powerful chemoattractant for polymorphonuclear leukocytes, whose migration to the intestinal mucosa is a hallmark of IBD lesions. The EAEC induced IL-8 release seems to be mediated by the interaction between flagellin and toll-like receptor 5 [24].

Although the extent of their involvement is unknown, the importance of *E. coli* for the lesions of IBD seems to become clear [24]. As mentioned above, adherence is a common property of these bacteria. Our results emphasize the importance of using a 3h adherence assay to separate strains apparently showing distinct virulence potentials but sharing an identical adherence phenotype. In addition, these data suggest that the EAEC-identifying aggregative adherence is a marker of the abundant *E. coli* found in both CD and UC patients. Also, the presence of a set of traditional virulence markers in only strains from the UC patients seems to indicate an association of distinct EAEC subgroups with UC. Accordingly, typical and attaching and effacing EAEC might be involved with UC but not with CD. This hypothesis should be tested in future studies, which also should focus at other intestinal pathogenic *E. coli*. On the other hand, given the pathological features of IBD, such as increased mucosa permeability and altered intestinal mucus, at least some of EAEC identified here might represent indigenous intestinal *E. coli* strains whose transepithelial migration could be facilitated by local changed conditions. Despite of the wide number of potential virulence factors described for EAEC, comprehension of their pathogenic mechanisms is still not complete. As new information become available, the significance of their increase in IBD patients must be better understood.

Table 1. Virulence genetic markers, respective primers, size of target sequences and amplifications conditions of PCR.

Virulence marker ^a	Primers (5'-3')	Sequence		Amplification conditions			References
		Size	Denaturation	Annealing	Extension	N° of cycles	
<i>eae</i>	1-ACGTTGCAGCATGGGTAATC	815	94°C/1'	56°/2'	72°C/1'	29	[12]
	2-GATCGGCAACAGTTTCACCTG						
pAA	1-CTGGCCAAAGACTGTATCAT	630	94°C/40"	53°C/1'	72°C/1'	29	[27]
	2-CAATGTATAGAAATCCGCTGTT						
<i>aggR</i>	1-GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254	95°/1'	52°C/1'	72°C/1'	30	[32]
	2-ACAGAATCGTCAGCATCAGC						
<i>ipaH</i>	1-GTATACACAAAAGAAGGAAGC	619	95°/1'	52°C/1'	72°C/1'	30	[32]
	2-GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGGTAC						
<i>ial</i>	1-CTGGATGGTATGGTGAGG	320	94°C/1'	43°C/2'	72°C/3'	25	[11]
	2-GGAGGCCCAACAATTATTTCC						

^a Virulence genetic markers: *eae*= *E. coli* attaching and effacing gene, pAA= plasmid of aggregative adhesion, *aggR*= aggregative adhesion R, *ipaH*= invasion plasmid antigen H, *ial*= invasion associated locus gene.

Table 2 Frequency of adhesion phenotypes in *E. coli* strain isolated from IBD Patients and controls.

Adhesion			
phenotype*	IBD (%)	Controls (%)	Total
AA3	25 (71.4) **	5 (26.3)	30
AA6	1 (2.8)	2 (10.5)	3
DA3	4 (11.4)	3 (15.8)	7
DA6	0	2 (10.5)	2
NA	5 (14.3)	7 (36.8)	12
Total	35	19	54

* Adhesion phenotypes to Hep-2 cells: AA, DA, NA respectively aggregative adhesion, diffuse adhesion and non-adherent *E. coli* strain expressed in 3 or 6 h contact with Hep-2 cells.

** $p < 0,02$

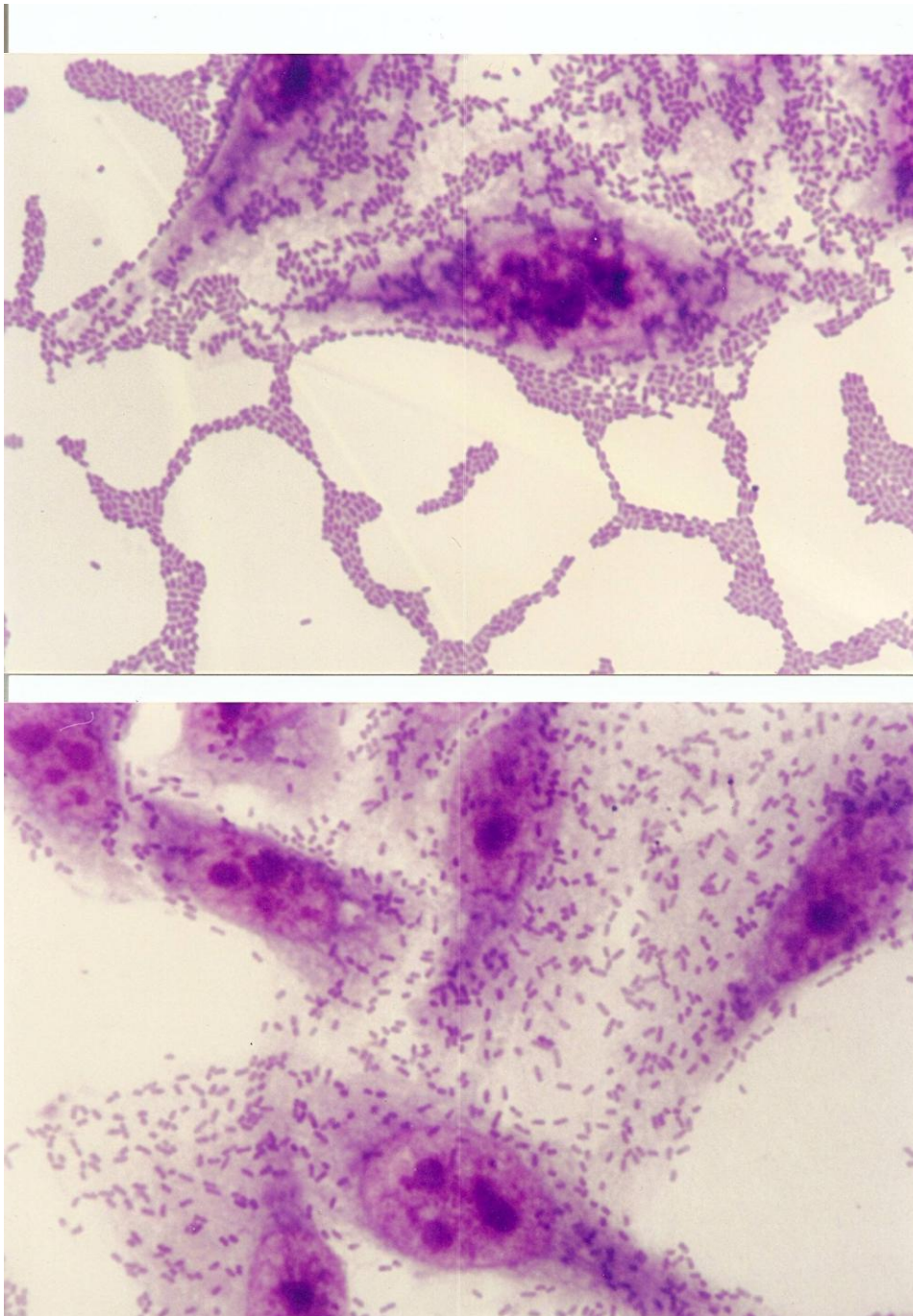
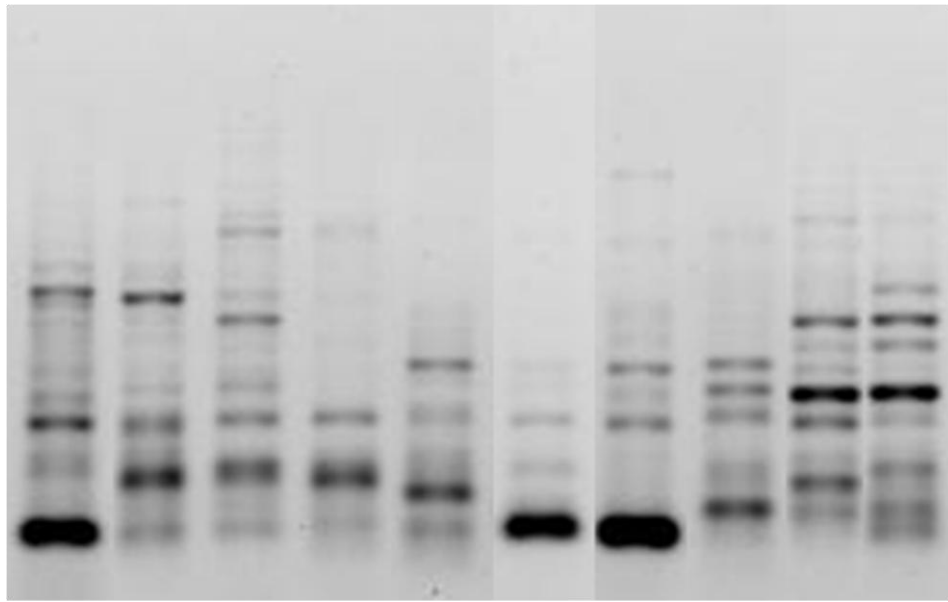


Figura 1. Padrões de adesão de *Escherichia coli* isoladas de pacientes com doença inflamatória intestinal. A- adesão agregativa. B- adesão difusa. Período de incubação= 3h. Aumento = 1000x. Coloração: May Grünwald.



B1 C1 C2 C3 B2 B3 B4 B5 C4 B6
 AA6 NA NA DA6 NA AA3 AA3 DA3 AA6 NA

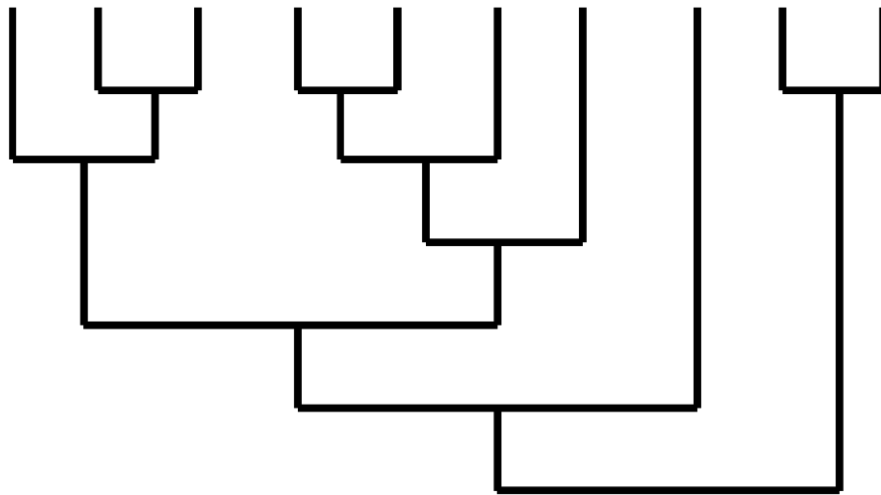


Figura 02. Relação genética por ERIC-PCR entre amostras aderentes em 3h, 6h e não aderentes

Legend to:

Fig. 1 - *E. coli* attached to HEp-2 cell monolayers displaying distinct adherence phenotypes: In aggregative adherence (AA), bacterial cells associate to each other to form characteristic stacked-brick like aggregates that are observed both on the monolayer and on the cell-free spaces of the glass slide (A), and in diffuse adherence (DA), bacterial cells are seen scattered only on the monolayer surface (B)

Fig. 2 - Dendrogram of the genetic relationship among 10 representatives of the 53 *E. coli* strains and respective ERIC-PCR fingerprints. Strains from IBD patients are labeled with the B, and those from controls, with the C letter. The adherence phenotypes (for legend, refer to Table 2) are indicated below the strains labels.

References

1. **Ardizzone, S., and G. P. Bianchi.** 2002. Inflammatory bowel disease: insights into pathogenesis and treatment. *J. Int. Med.* **256**:475-496.
2. **Boudeau, J., A. L. Glasser, E. Masseret, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud.** 1999. Invasive Ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* **67**:4499-4509.
3. **Campieri, M., and P. Gionchetti.** 2001. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut.* **48**:132-135.
4. **Cohavy, O., D. Bruckner, L. K. Gordon, R. Misra, B. Wei, M. E. Eggena, S. R. Targan, and J. Braun.** 2000. Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related protein epitope. *Infect. Immun.* **68**:1542-1548.
5. **Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, and B. Rowe.** 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* **3**:95-99.
6. **Darfeuille-Michaud, A.** 2002. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**:185-193.
7. **Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, P. Bulois, C. Neut, A. L. Glasser, N. Barnich, M. A. Bringer, A. Swidsinski, L. Beaugerie, and J. F. Colombel.** 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology.* **127**:412-421.

8. **Darfeuille-Michaud, A., C. Neut, N. Barnich, E. Lederman, P. Di Martino, P. Desreumaux, L. Gambiez, B. Joly, A. Cortot, and J. Colombel.** 1998. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. **115**:1405-1413.
9. **Duchmann, R., E. May, M. Heike, P. Knolle, M. Neurath, and K.-H. Meyer zum Buschenfelde.** 1999. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut*. **44**:812-818.
10. **Farina, C., Caprioli, A, I. Luzzi, A. Sonzogni, and A. Goglio.** 1995. Ulcerative colitis precipitated by a verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection. *Ital. J. Gastroenterol.* **27**:498-500.
11. **Frankel, G., L. Riley, J. A. Giron, J. Valmassoi, A. Friedmann, N. Strockbine, S. Falkow, and G. K. Schoolnik.** 1990. Detection of *Shigella* in feces using DNA amplification. *J. Infect. Dis.* **161**:1252-1256.
12. **Gannon, V. P. J., M. Rashed, R. K. King, and E. J. Thomas.** 1993. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1268-1274.
13. **Giaffer, M. H., C. D. Holdsworth, and B. I. Duerden.** 1992. Virulence properties of *Escherichia coli* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. **33**:646-650.

14. **Hendrickson, B. A., R. Gokhale, and J. H. Cho.** 2002. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:79-94.
15. **Jiang, Z. D., D. Greenberg, J. P. Nataro, Steffen R., and H. L. Dupont.** 2002. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4185-4190.
16. **Johnson, J. R., and O. B. T. T.** 2000. Improved repetitive element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**:265-273.
17. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev.* **2**:123-140.
18. **Kotlowski, R., C. N. Bernstein, S. Sepehri, and D. O. Krause.** 2007. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut.* **56**:669-675.
19. **Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics.* **5**:150-163.
20. **Martin, H. M., B. J. Campbell, C. A. Hart, C. Mpofu, M. Nayar, R. Singh, H. Englyst, H. F. Williams, and J. M. Rhodes.** 2004. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology.* **127**:80-93.

21. **Mylonaki, M., N. B. Rayment, D. S. Rampton, B. N. Hudspith, and J. Brostoff.** 2005. Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **11**:481-487.
22. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**(1):142-201.
23. **Nazli, A., P. C. Yang, J. Jury, K. Howe, J. L. Watson, J. D. Soderholm, P. M. Sherman, M. H. Perdue, and D. M. McKay.** 2004. Epithelia under metabolic stress perceive commensal bacteria as a threat. *Am. J. Pathol.* **164**:947-957.
24. **Rhodes, J. M.** 2007. The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut.* **56**:610-612.
25. **Ryan, P., R. G. Kelly, G. Lee, J. K. Collins, G. C. O'Sullivan, J. O'Connell, and F. Shanahan.** 2004. Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease--detection by laser capture microdissection and PCR. *Am. J. Gastroenterol.* **99**:1539-1543.
26. **Sasaki, M., S. V. Sitaraman, B. A. Babbin, P. Gerner-Smidt, E. M. Ribot, N. Garret, J. A. Alpern, A. Alkyildiz, A. L. Theiss, A. Nusrat, and J. Klapproth.** 2007. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Labor. Invest.* **00**:1-13.

27. **Schimdt, H., C. Knop, S. Franke, S. Aleksic, J. Heesemann, and H. Karch.** 1995. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **33(5):**701-705.
28. **Schultsz, C., M. Moussa, R. van Ketel, G. N. J. Tytgat, and J. Dankert.** 1997. Frequency of pathogenic and enteroadherent *Escherichia coli* in patients with inflammatory bowel disease and controls. *J. Clin. Pathol.* **50:**573-579.
29. **Seksik, P., L. Rigottier-Gois, G. Gramet, M. Sutren, P. Pochart, P. Marteau, R. Jian, and J. Dore.** 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut.* **52:**237-242.
30. **Steiner, T. S., A. A. M. Lima, J. P. Nataro, and R. L. Guerrant.** 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **177:**88-96.
31. **Tabaqchali, S., D. P. O'donoghue, and K. A. Bettelheim.** 1978. *Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* **19:**108-113.
32. **Toma, C., Y. Lu, N. Higa, N. Nakasone, I. Chinen, A. Baschkier, M. Rivas, and M. Iwanaga.** 2003. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **41:**2669-2671.

V. Conclusões:

Na presente série de casos de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal, a análise da microflora associada à mucosa do reto nos permite concluir que:

1 - Pacientes com Doença Inflamatória Intestinal apresentam aumento significativo da densidade de colonização por *Escherichia coli* na microbiota associada à mucosa do reto, quando comparados a seus respectivos controles.

2 - O aumento da densidade de colonização por *Escherichia coli* em cada paciente com Doença Inflamatória Intestinal é constituído por uma mesma linhagem ou clone de *Escherichia coli*, conforme documentado pela tipagem molecular por ERIC-PCR.

3 - Não houve similaridade genética entre as amostras de *Escherichia coli*, isoladas de diferentes pacientes com Doença Inflamatória Intestinal, pela tipagem molecular por ERIC-PCR da Doença Inflamatória Intestinal.

4 - As amostras de *Escherichia coli* identificadas nos pacientes com Doença Inflamatória Intestinal expressam padrão agregativo-aderente (AA), pertencem portanto ao grupo das cepas enteroagregativas, que compreendem cepas comensais ou patogênicas.

5 - A prevalência de adesão a células HEp-2 nos ensaios *in vitro* de patogenicidade de 3 horas foi duas vezes maior nas amostras de *Escherichia coli*, isoladas de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal do que nos respectivos controles.

A participação das cepas enteroagregativas de *Escherichia coli* na patogênese e/ou manutenção das lesões da Doença Inflamatória Intestinal deve continuar a ser investigada.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível superior) e CNPQ processo n. 473983 -2008.