

Josias Rodrigues

Pesquisa de Alguns Marcadores de Patogenicidade
em *Escherichia coli* da Microbiota Entérica de
Pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Botucatu SP
2011

Josias Rodrigues

Pesquisa de Alguns Marcadores de Patogenicidade
em *Escherichia coli* da Microbiota Entérica de
Pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Julio de
Mesquita Filho” como pré-requisito para
obtenção do título de Livre Docente em
Microbiologia – área de Bacteriologia

Botucatu SP
2011

Este trabalho teve apoio financeiro da Fapesp (Processo 2008/10975-0) e Fundunesp (Processo 01196/04-DFP)

AGRADECIMENTOS

Os resultados aqui apresentados foram obtidos com a valiosa contribuição dos seguintes colegas e alunos, a quem manifesto meu cordial agradecimento:

Dr. Carlos R. Victoria, Gastroenterologista aposentado do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu

Dr. Augusto C. Montelli, Professor Emérito da Faculdade de Medicina de Botucatu

Dra. Maria A. M. Rodrigues, Professora Titular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu

Dr. Fernando G. Romeiro, Gastroenterologista do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu

Dra. Ligia Sasaki, Gastroenterologista do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu

Alunas de Pós Graduação Danyelle A. Samegima e Cristiane M. Thomazini

Estagiário (a) s Ana C. Santos, Vanessa Rafaela, Helton L. de Souza, Jean Filipe Marques Fernanda P. C. Pedrosa e Maria Eugênia

Colegas Docentes e Técnicos Administrativos, em especial à Sonia Faraldo, Leonice, Luis Severino e Luis Alquati, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP

Sumário

RESUMO.....	1
Lista de Abreviaturas:.....	4
I. REVISÃO DA LITERATURA	5
II. OBJETIVOS	15
III. PACIENTES E METODOLOGIA	16
1. Pacientes	16
2. Material Clínico	17
3. Cultura e identificação de <i>E. coli</i>	19
4. Quantificação Bacteriana	20
a) Em TSA e Ágar MacConkey.....	20
b) Em Ágar sangue, MacConkey, Cromocult e Wilkins-Chalgren.....	20
5. Caracterização das amostras de <i>E. coli</i>	21
a) Tipagem por ERIC2-PCR	21
b) Detecção, por PCR, de marcadores genéticos de virulência	24
c) Testes de Interação com linhagens de células HEp-2	24
IV. RESULTADOS	30
1. Variação na Concentração Bacteriana.....	30
a) Bactérias Gram negativas	30
b) Aeróbios/Facultativos e Anaeróbios	33
2. Propriedades de virulência de <i>E. coli</i>	37
a) Diversidade de ERIC-tipos.....	38
b) Invasão a células HEp-2.....	38
c) Adesão a células HEp-2	40
d) Marcadores de Virulência de <i>E. coli</i> diarreio gênicas	40
e) Genes de virulência em Amostras de <i>E. coli</i> agregativas.....	43
f) Perfil de Sensibilidade a Drogas	44
V. DISCUSSÃO	48
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
Aprovação do Comitê de Ética	68

RESUMO

A doença inflamatória intestinal (DII) é um quadro patológico marcado pela ocorrência de lesões de gravidade variável ao longo do trato intestinal. Os sintomas se manifestam na forma de duas variantes clínicas distintas: retocolite ulcerativa (RU) e doença de Crohn (DC). A DC pode afetar qualquer parte do trato gastrintestinal (TGI), desde a boca até o ânus, podendo em casos raros, acometer tecidos extraintestinais. A RU restringe-se ao intestino grosso. A predisposição para seu desenvolvimento e a causa da doença dependem de múltiplos fatores, incluindo a Genética, dieta, tabagismo, imunidade e a microbiota intestinal. Sendo uma das bactérias dominantes entre os aeróbios facultativos do cólon intestinal, a *Escherichia coli* tem sido foco da maioria dos estudos relacionados à microbiota. Diferentes trabalhos têm demonstrado que estas bactérias são aumentadas em pacientes com DII. Considerando-se o peso do fator genético e que pouco ou nenhum estudo equivalente tem sido realizado com a população brasileira, a proposta deste trabalho consistiu na avaliação quantitativa de alguns grupos bacterianos, em diferentes materiais clínicos de pacientes com DII. Para isto, foi investigado um total de 110 pacientes do atendimento de rotina do HC/UNESP, distribuídos em 3 categorias: 52 controles, 20 portadores de DC e 38 portadores de RU. Os espécimes clínicos consistiram majoritariamente de biópsias do reto e, em menor número, de fezes e biópsias de outros segmentos da mucosa intestinal. Análise da variação na concentração bacteriana aplicada às espécimes de um subgrupo destes pacientes (24 controles, 17 portadores de RU e 14 de DC) revelou que, em geral, portadores de DII apresentam uma maior concentração média de bactérias Gram negativas, Gram positivas e de outros microrganismos em diferentes segmentos da mucosa

intestinal, do que a observada nos sítios correspondentes de controles. Por outro lado, nas fezes, a contagem microbiana dos portadores de DII foi inferior à observada em controles. O sítio da mucosa com maior diferença (29x) na concentração bacteriana entre casos e controles foi o reto de portadores de DC. Os grupos bacterianos em que esta diferença foi maior consistiu de *E. coli* e outros coliformes. As amostras de *E. coli* foram submetidas a ensaios de caracterização, incluindo testes de interação (invasão e adesão) com linhagens de células epiteliais HEP-2, PCR para genes de virulência e antibiograma. De um total de 44 amostras isoladas de biópsias retais e pertencentes a cada um dos três grupos de estudo, nenhuma se mostrou invasora. Para o teste de adesão, foram analisados 173 espécimes clínicos, consistindo de fezes e biópsias de mucosa. Independente do espécime clínico analisado, não houve diferença significativa na prevalência de amostras aderentes entre portadores de DC (9,2%) e controles (9,9%). Todavia, em portadores RU, observou-se uma maior prevalência de amostras aderentes (21,4%, $p < 0,05$). As amostras aderentes majoritariamente (81%) expressaram o padrão de adesão agregativo (AA), tendo sido mais abundantes no reto de portadores de RU. Um total de 162 amostras bacterianas (de 72 indivíduos) com diferentes fenótipos de adesão foi submetido à PCR para a detecção de genes de virulência típicos de *E. coli* diarreiogênicas (*eae*, *elt*, *ipaH*, *aggR* e *stx*). Uma fração de 64% dos portadores de RU, 26% de controles e 30% de portadores de DC apresentaram *E. coli* positivas para pelo menos 1 dos marcadores de virulência investigados. Amostras AA+ e não aderentes foram submetidas a PCRs adicionais para pesquisa do plasmídeo de adesão agregativa (pAA) e genes para citotoxinas da família das serina-proteases autotransportadoras (SPATES), *irp2*, envolvido na expressão de sideróforos e *shf*,

uma sequência críptica. Estes marcadores são comuns nas *Escherichia coli* enteroagregativas (EAEC). Os resultados indicaram uma maior prevalência destes genes em cepas AA+ isoladas dos pacientes. No conjunto, estes dados sugerem que os portadores de DII, desta população, apresentam um aumento na concentração das bactérias Gram negativas totais, Gram negativas e outros microrganismos aeróbios/facultativos. Entre as bactérias Gram negativas, observa-se um aumento pronunciado de Enterobactérias, particularmente *E. coli*, no reto. A caracterização destas bactérias indicou uma maior prevalência de amostras aderentes e dotadas de genes de virulência em portadores de DII. Embora a extensão do envolvimento destas bactérias com a DII não possa ser inferida com base nestes dados, considerando-se o papel (deduzido a partir de experimentos *in vitro*), para alguns destes fatores de virulência (como a formação de biofilmes por EAEC), a presença de tais organismos na mucosa deve pelo menos contribuir para o agravamento dos sintomas da doença.

Lista de Abreviaturas:

AA: adesão agregativa

AD: Adesão difusa

AIEC: “Adherent and Invasive” *E. coli*

CIM: Concentração inibitória mínima

DC: Doença de Crohn

DII: Doença Inflamatória Intestinal

EAEC: “Enteraggregative” *E. coli*

ECD: *E. coli* diarreiogênica

EIEC: “Enteroinvasive” *E. coli*

EPEC: “Enteropathogenic” *E. coli*

ETEC: “Enterotoxigenic” *E. coli*

MEM: Meio essencial mínimo

NA: Não aderente

ORF: Open Reading Frame

PBS: “Phosphate buffered saline”

RU: Retocolite ulcerativa

SFB: Soro fetal bovino

SPATE: serina proteases autotransportadoras

STEC: “Shiga toxin producing” *E. coli*

TBE: Tris Borato EDTA

TSA: “Tryptic soy agar”

TSB: “Tryptic soy broth”

UFC: Unidade formadora de colônia

TLR: “Toll-like receptors”

I. REVISÃO DA LITERATURA

Processos inflamatórios crônicos de causa não completamente definida provocam lesões ao longo do trato gastrointestinal 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 de regiões desenvolvidas. No Brasil, embora as informações sejam escassas, dados da década passada indicam aumento de sua incidência (49, 57).

A DII apresenta-se sob duas formas clínicas principais: a retocolite ulcerativa (RU) e a doença de Crohn (DC) (19), que podem afetar desde a superfície de mucosa até regiões mais profundas.

Na RU, a resposta inflamatória restringe-se ao intestino grosso, particularmente a mucosa retal, que é afetada em 95% dos casos. As lesões ocorrem superficialmente, de forma contínua e com gravidade variável. Histologicamente observam-se inflamação crônica e aguda com infiltrado de leucócitos polimorfonucleares e monócitos, abscessos das criptas e distorção das glândulas. Há diarreia, com muco e sangue e dores abdominais de extensão variável.

A DC pode afetar, de forma descontínua, qualquer parte do trato gastrointestinal, desde a orofaringe até a região perianal. A inflamação pode ser profunda, transmural, atingindo a serosa e levando à formação de fístulas. Observam-se pequenas ulcerações superficiais sobre as placas de Peyer e inflamação crônica focal estendendo-se à submucosa. A região íleo-cecal é a mais atingida. Ao contrário da RU, onde a presença de sangue nas fezes

significa um alerta, apressando a busca pelo diagnóstico, o reconhecimento da DC é mais sutil e tardio. Os sintomas são variáveis e dependem da região acometida. Eventualmente, os sintomas de DC colônica podem se confundidos com RU, 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 (19). Vários fatores genéticos e ambientais são determinantes para a ocorrência da DII.

Evidências do envolvimento de fatores genéticos são múltiplas como, por exemplo, uma maior predisposição de parentes de portadores em serem acometidos pela doença (14), um maior índice de concordância na associação de portadores de RU entre gêmeos monozigóticos do que dizigóticos (55) e anomalias imunológicas como uma maior frequência de anticorpos contra determinados antígenos em parentes de primeiro grau de portadores de DII (14). Estas constatações motivaram estudos que levaram à identificação de um gene associado à causa da DC (20, 36). 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 β), responsável pelo controle da expressão de várias citocinas pró-inflamatórias tais como a interleucina 1 e o fator de necrose tumoral (TNF α) (1). 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- κ B, 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 (15). 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 RU, mas uma piora no quadro clínico da DC. Parentes de pacientes com DC, mas não os de RU, apresentam maior permeabilidade da mucosa intestinal. A dieta parece influenciar os sintomas da DC, mas não da RU. Além disto, componentes genéticos parecem ser mais relevantes para o surgimento da DC do que da RU.

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* (27) e a existência, em tecidos de lesão, de uma maior concentração de DNA bacteriano do que em preparações normais da mucosa (42). Evidências indiretas do papel da microbiota incluem a constatação de que pacientes com DC submetidos cirurgicamente a desvio do fluxo fecal apresentam uma regressão nas lesões, as quais ressurgem com o retorno à via normal de fluxo (41). Também, o uso de antibióticos tem sido considerado alternativa terapêutica para a DII (38).

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*) são aumentadas, ao passo

que de *Bifidobacterium* são reduzidas (34). 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 de representantes potencialmente patogênicos – um fenômeno referido como disbiose (12). 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.

Como um dos principais membros da microbiota intestinal humana, *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. Conforme mencionado acima, 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 (39). Além disto, estes pacientes apresentam anticorpos não só em título maior, mas também contra uma maior diversidade de antígenos O de *E. coli* (53). Em portadores de DC e, em menor grau, de RU, há uma maior prevalência de indivíduos com uma resposta humoral intensa contra a porina OmpC de *E. coli* do que em indivíduos-controles (40), tendo sido demonstrada uma associação direta desta resposta com a gravidade da DC (33).

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 DC (6). Esta hipótese tem por base resultados de alguns estudos em que não se observou 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 (17, 47).

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 do que de controles. Embora, em alguns casos, 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 (28), o tempo de incubação destas com as células hospedeiras e os critérios de determinação do número de bactérias aderidas à preparação (11). 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 (5) (17). Empregando-se linhagens de células HEp-2 (originárias de carcinoma de laringe), em testes de 6h, Schultz et al (46), não encontraram diferenças na prevalência de bactérias aderentes entre os grupos. Em testes com linhagens celulares originárias tanto do intestino grosso (Caco-2) como do intestino delgado (*Intestine 407*), em ensaios de 3h, Darfeuille-Michaud et al (11) observaram uma maior prevalência de *E. coli* aderentes em pacientes com DC. A capacidade de adesão a células eucarióticas em testes *in vitro* é comum entre patótipos clássicos de *E.*

coli diarreio gênicas (ECD) (35). Apesar de as linhagens isoladas de casos de DII compartilharem esta propriedade com estes patótipos, segundo alguns autores elas não apresentam os genes das adesinas e outros fatores de virulência correspondentes (11, 26), sugerindo que a interação celular possivelmente acontece através de mecanismos distintos do observado nos patótipos clássicos.

Os pacientes com DC, em particular, apresentam uma maior prevalência de linhagens capazes de invadir células caco-2 (43). Estudos detalhados de uma destas linhagens invasoras 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 (35). Diferentemente do que se observa para EIEC e outras categorias de *E. coli* que parasitam células eucarióticas, a internalização é dependente de microtúbulos (4). As *E. coli* invasoras encontradas em portadores de DC são capazes de replicar no interior de células epiteliais intestinais e macrófagos e, nestes, induzem a produção de TNF- α (10). Estas diferenças justificaram o seu reconhecimento como uma nova categoria patogênica, referida como “adherent-invasive *E. coli*” (AIEC) (9). 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 (3) e a regulação da expressão de fatores de virulência se dá à custa de porinas OmpC e de flagelos (40). Além disto, estas bactérias são capazes de formar granulomas (31). Conforme mencionado, as características de AIEC são distintas das de EIEC e resumem-se a três propriedades (40): 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 DC submetidos à cirurgia (10), sugerindo possível ligação com sua causa. Com base nas informações disponíveis, acredita-se que a patogênese de *E. coli* na DC 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 (9), 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 (28).

Pelo menos no caso da DC, 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 (39). A concentração de *E. coli* intracelulares (28) e aderidas (26) na superfície de biópsias do cólon de pacientes com DC 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 (28). Estas *E. coli* destacam-se pela

capacidade de aglutinar eritrócitos humanos, uma propriedade que se correlaciona com a capacidade de adesão e invasão celular (28). Acredita-se que a adesão bacteriana seja mediada pela ligação de fímbrias a glicoproteínas ou glicolípídeos 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 (28).

Conforme já mencionado, o modelo de patogênese sugerido para *E. coli* na DC 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 (40). Embora o conhecimento sobre o papel de *E. coli* na RU seja menor, o envolvimento destas bactérias parece se dar por um mecanismo distinto, não relacionado à invasão. Conforme o modelo proposto por Rhodes (39), 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 (7). 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 (35). Por exemplo, o fenótipo agregativo é expresso por uma das categorias diarreioagênicas mais estudadas atualmente – a *E. coli* enteroagregativa (EAEC). As EAEC induzem expressão de IL-8 (citocina pró-inflamatória) pelas células da mucosa intestinal (21). 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 (58). A ausência de fatores de virulência típicos de ECD 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 patótipos de infecções extraintestinais (26).

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 (13). Estudos quantitativos, baseados na análise genética, por métodos independentes de cultivo, têm mostrado que estas bactérias também estão aumentadas nestes pacientes (48). Inúmeras funções têm sido atribuídas à microbiota e sua influência na homeostase intestinal é 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.

II. OBJETIVOS

- Promover uma avaliação quantitativa da população de *E. coli* e de outros grupos bacterianos encontrados no trato intestinal de portadores de DC e RU
- Proceder à caracterização das amostras de *E. coli* isoladas, através da pesquisa de alguns fatores de patogenicidade.

III. PACIENTES E METODOLOGIA

1. Pacientes

Os resultados aqui apresentados foram baseados na análise de dois conjuntos distintos de indivíduos, estudados em dois momentos diferentes. O primeiro estudo foi realizado entre 2002 e 2006 (Estudo A) e o outro, entre 2009 e 2011 (Estudo B). A tabela 1 apresenta características dos pacientes analisados em cada um destes períodos. Nem todos os indivíduos em cada grupo foram submetidos a todos os testes realizados. Deste modo, haverá uma menção em cada item (nesta seção e na seção “Resultados”), sobre o grupo correspondente, bem como o número de indivíduos analisados.

O conjunto dos pacientes em ambos os estudos compreendeu indivíduos atendidos no Setor de Endoscopia do Hospital Universitário da UNESP, para exames rotineiros de colonoscopia. No conjunto (A+B) foram estudados 20 portadores de doença de Crohn (DC), 38 portadores de RU e 52 controles, totalizando 110 indivíduos (tabela 1). Os controles corresponderam a pacientes submetidos ao exame em função de apresentarem outras patologias intestinais de natureza não infecciosa (Por exemplo, presença de pólipos, diverticulite e suspeita de neoplasias) ou indivíduos que ao final dos exames mostraram-se livres de qualquer tipo de patologia intestinal. Como critério de exclusão foi considerado a antibioticoterapia e a presença de diarreia infecciosa nos últimos 40 dias. O diagnóstico de DII se baseou em critérios clínicos e exames histopatológicos, a partir dos quais foi feita a avaliação do estágio ou grau de atividade da doença (leve, moderada ou intensa). Todas as informações clínicas foram registradas num formulário padrão (página 66), que também incluiu dados

histopatológicos e informações concernentes ao uso prévio de qualquer tipo de droga pelos pacientes. Só participaram dos estudos indivíduos que, após tomarem ciência dos procedimentos, concordaram formalmete em participar do mesmo (Termo de consentimento, página 70). Todo o projeto foi desenvolvido em observância às determinações do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, cujos certificados de aprovação são apresentados na página 68. Nos pacientes do estudo A, a análise foi majoritariamente feita em biópsias retais e no estudo B, foi em fezes e biópsias de diferentes segmentos da mucosa do intestino grosso e íleo.

2. Material Clínico

O material consistiu de fezes e biópsias (Estudo B) ou de apenas biópsias (Estudo A). A colheita de fezes foi feita imediatamente antes do preparo para o exame colonoscópico, que consistiu em jejum parcial (ingestão de alimentos líquidos) e uso de laxante, aproximadamente 48 horas antes do exame. Neste período, as fezes (acondicionadas em frascos coletores secos e esterilizados) foram mantidas em geladeira.

A colheita das biópsias foi realizada, por um médico gastroenterologista, com uma pinça colonoscópica direcionada para os sítios do exame com o auxílio de uma microcâmara, cujas imagens amplificadas eram transmitidas para um monitor. Imediatamente após a colheita, as biópsias foram dispensadas em frascos de 1,5 a 2,0 ml contendo salina a 0,85 % estéril. Nos portadores de DII, procurou-se coletar biópsias de superfícies da mucosa com lesões evidentes. Em todos os casos, de cada região do intestino, coletou-se apenas um fragmento de tecido, que em geral tinha um peso médio de 5 mg.

Tabela 1. Número, faixa etária e sexo dos de indivíduos envolvidos em cada estudo

(a)(*)

Faixa etária	Estudo A			Estudo B			Total
	Cont	DC	RU	Co	DC	RU	
15-25	0	3 (0) ^(§)	1(1)	1 (0)	1 (1)	0	6 (2)
26-59	8 (4)	2 (1)	18 (9)	18 (13)	8 (6)	10 (8)	64 (41)
60-89	7 (3)	2 (1)	2 (1)	14 (9)	2 (0)	4 (2)	31 (16)
NR ^(#)	1 (1)	0	0	3 (2)	2 (1)	3 (2)	9 (5)
Total	16 (8)	7 (2)	21 (11)	36 (24)	13 (8)	17 (12)	110 (64)

(a) Período de cada estudo: 2002-2006, para A e 2009-2011, para B.

(#) NR: Faixa etária não registrada

(*) Grupos: Cont, controle; DC, Doença de Crohn; RU, Retocolite ulcerativa

(§) (), N° de indivíduos do sexo feminino em cada faixa etária.

3. Cultura e identificação de *E. coli*

Após a colheita, juntamente com as fezes trazidas pelos pacientes, as biópsias foram imediatamente levadas para o laboratório onde foram processadas em no máximo 2h, após o exame colonoscópico.

Conforme já mencionado, dos pacientes do Estudo A foram analisadas apenas biópsias, a maioria das quais sendo da mucosa do reto. Destes pacientes, o material clínico foi diretamente semeado (por esgotamento) em placas de ágar MacConkey, que foram incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. A menos que indicado, estas foram as condições de todas as culturas bacterianas nos testes aqui descritos. A partir do crescimento em MacConkey, um número de até 5 colônias fermentadoras de lactose e, ocasionalmente, algumas não fermentadoras de lactose foram individualmente transferidas para os meios de EPM, MILI e Citrato de Simmons e incubadas nas mesmas condições da etapa de isolamento. No dia seguinte, após a leitura das provas bioquímicas, as colônias identificadas como *E. coli* foram cultivadas em caldo BHI, para estocagem com 15% de glicerol, a -70°C.

No caso do Estudo B, as biópsias foram inicialmente trituradas, com o uso de areia estéril em vórtex, na solução salina em que foram coletadas. A partir da suspensão inicial e, após diluições seriadas (ver item seguinte), uma alíquota de 100 µL da última diluição foi espalhada com alça de Drigalsky no meio de MacConkey, sendo a identificação e a estocagem bacteriana realizada conforme mencionado acima. A detecção de *E. coli* nas fezes seguiu o mesmo procedimento, diferindo apenas pelo *não* acréscimo de areia durante homogeneização no vórtex, para obtenção da suspensão a ser diluída.

4. Quantificação Bacteriana

a) Em TSA e Ágar MacConkey.

Com o objetivo de avaliar variação quantitativa na população de bactérias Gram negativas e outros grupos aeróbios/facultativos, materiais clínicos (fezes e biópsias de diferentes segmentos de mucosa) de 43 pacientes (9 portadores de DC, 13 diagnosticados com RU e 21 controles) foram processados conforme descrição acima, previamente a diluições seriadas, semeados em placas de ágar MacConkey e TSA e incubados em tensão normal de oxigênio, por até 48 horas. As diluições foram feitas a partir de amostras pesando em torno de 5 mg, trituradas e/ou suspensas em 100 µL de solução salina. As suspensões foram submetidas a diluições variando de 30 a $8,1 \times 10^5$ vezes, dependendo da natureza, sítio da mucosa e respectivo peso. Após a cultura, cada placa foi submetida a contagem de UFC sendo a concentração bacteriana expressa em termos de UFC/mg. Resultados obtidos em placas com crescimento excessivo (incontável) ou apresentando poucas colônias (inferior a 30) não foram considerados, sendo repetido o procedimento de quantificação, a partir de uma nova diluição das suspensões (que foram preservadas em geladeira).

b) Em Ágar sangue, MacConkey, Cromocult e Wilkins-Chalgren.

Seguindo os mesmos procedimentos de diluição acima descritos, amostras de matérias clínicos de um segundo grupo de pacientes (4 portadores de DC, 3 diagnosticados com RU e 7 controles) foram submetidas a avaliação comparativa

da concentração de microrganismos totais aeróbios/facultativos (bactérias Gram negativas, *E. coli* e outros microrganismos). Para isto, alíquotas da diluição foram semeadas em ágar sangue, ágar MacConkey, Cromocult para coliformes e Ágar Wilkins-Chalgren. Este último foi incubado em jarra hermeticamente fechada, contendo reagente para eliminação de O₂ (Anaerogen, Oxoid). Após cultivo por até 48 horas, as placas foram submetidas à quantificação das UFC.

De cada material clínico, uma alíquota de 50 µL da suspensão inicial (não diluída) foi cultivada em caldo MacConkey, visando o crescimento de um número máximo possível representativo (*pools*) da população de *E. coli* de cada amostra, para posterior pesquisa de genes de virulência e isolamento de linhagens de interesse. Estes *pools* foram acrescidos de 15% de glicerol e estocados a -70°C. O fluxograma da figura 1 apresenta a sequência de processamento das amostras visando cultivo para análise quantitativa da população bacteriana, obtenção dos *pools* e estocagem de material clínico.

5. Caracterização das amostras de *E. coli*

a) Tipagem por ERIC2-PCR

A análise da relação de similaridade ou divergência entre as amostras bacterianas foi feita através da comparação do perfil de bandas de DNA gerados pela amplificação (por PCR) de regiões entre sequências repetitivas específicas (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*), conforme metodologia de Johnson e colaboradores (22), em que se acrescentou modificações na técnica original (56). Estas modificações consistiram no uso de um único oligonucleotídeo (ERIC2, 5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3') e aumento da temperatura de anelamento, associado à rampagem (*touchdown*). Tais

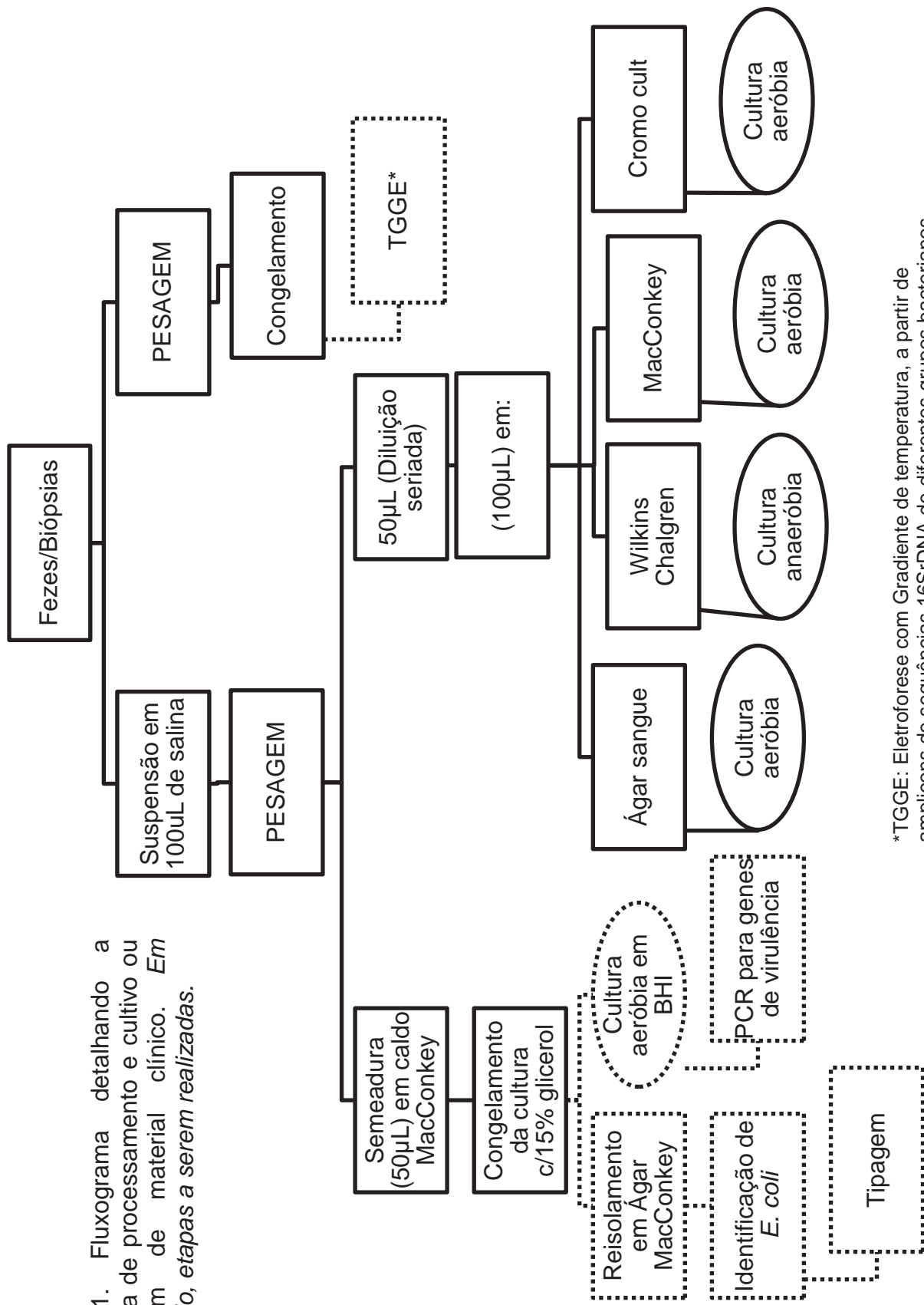


Figura 1. Fluxograma detalhando a sequência de processamento e cultivo ou estocagem de material clínico. Em pontilhado, etapas a serem realizadas.

*TGGE: Eletroforese com Gradiente de temperatura, a partir de amplicons de sequências 16SrDNA de diferentes grupos bacterianos

modificações visaram à redução do número de banda espúrias, nos perfis de bandas (*fingerprints*) gerados pela PCR. O DNA usado como molde, foi acrescentado nas misturas da reação na forma de lisados brutos, obtidos pela fervura, por 10 minutos (em água destilada), de bactérias cultivadas por uma noite.

A mistura máster, num volume de 50 μL consistiu de 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM do primer, 0,7 U de *TaqDNA* polimerase e 5 μL de tampão. A mistura foi feita em cabine livre de DNA contaminantes e do DNA molde. Este foi acrescentado em lisados, em volumes de 5 μL , fora da cabine. As PCRs foram realizadas em um termociclador da marca Eppendorf modelo ProS, ou em um Minitermociclador (MJ Research), nas seguintes condições: 1) Desnaturação preliminar de 94 °C/2min, desnaturação na mesma temperatura por 30 s, redução progressiva a 1,5 °C/s (rampagem) até a temperatura de anelamento (1º ciclo, 1,5 °C acima do “plateau”) e redução a 0,5 °C/ciclo até a temperatura de “plateau”; 2) Anelamento por 1 minuto, rampagem a 0,1 °C/s até 72 °C (temperatura de extensão) por 4,5 minutos. A fase “plateau” consistiu de 25 ciclos de desnaturação a 94 °C/30s, rampagem a 1,5 °C/s até a temperatura de anelamento, temperatura de “plateau”, anelamento por 1 min, rampagem a 0,1 °C/s até 72°C e extensão por 4,5 min a 72 °C, seguida de uma extensão final de 72 °C/1 min.

O DNA amplificado foi separado por eletroforese em gel composto por 1% de agarose em tampão TBE acrescido de intercalante gel-red (Biotium) numa diluição final de 10^{-4} .

b) Detecção, por PCR, de marcadores genéticos de virulência

A tabela 2 apresenta a relação de marcadores genéticos de virulência investigados. Pelo menos uma amostra de cada paciente de ambos os Estudos (A e B), num total de 162 amostras, foram submetidas a multiplex PCR (54) para a detecção de marcadores típicos das principais categorias ECD: *ipaH*, para EIEC, *aggR*, para EAEC, *elt* para ETEC, *stx* para STEC e *eae* para EPEC. As amostras do estudo A foram adicionalmente analisadas quanto à presença dos demais genes relacionados na tabela 2. Foram usados os seguintes controles positivos EAEC O42, EPEC E2348/69, ETEC 40T, EIEC EIX, SLT EHX. Como controle negativo foi empregada a *E. coli* K12 HB101.

A mistura máster, adquirida comercialmente (invitrogen), foi diluída, conforme recomendações da bula, sendo acrescentados os oligonucleotídeos em concentrações variáveis de acordo com as sequências-alvo. As amplificações aconteceram em reações de 30 ciclos, com desnaturação de 94 °C e extensão de 72° C, ocorrendo ambas durante 1 minuto. A temperatura de anelamento de cada PCR, bem como a sequência dos oligonucleotídeos, constam na tabela 2.

c) Testes de Interação com linhagens de células HEp-2

Para obtenção de monocamada celular utilizada nos testes de adesão e invasão, as linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de poliestireno com área de 75 cm², contendo 25 ml de MEM suplementado com 10 % de soro fetal

Tabela 2. Marcadores genéticos de virulência, oligonucleotídeos e temperatura de anelamento da PCR.

MARCADOR ^a	OLIGONUCLEOTÍDEOS (5'-3')	T (°C) Anelamento	REFERÊNCIA
<i>eae</i>	1-ACGTTGCAGCATGGTAACTC	56	(54)
	2-GATCGGCAACAGTTTCACCTG		
<i>pAA</i>	1-CTGGCCAAAGACTGTATCAT	53	(44)
	2-CAATGTATAGAAATCCGCTGTT		
<i>aggR</i>	1-GTATACACAAAAGAAGGAAAGC	52	(54)
	2-ACAGAATCGTCAGCATCAGC		
<i>ipaH</i>	1-GTATACACAAAAGAAGGAAAGC	5	(54)
	2-GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGGTAC		
<i>ial</i>	1-CTGGATGGTATGGTGAGG	43	(16)
	2-GGAGGCCAACAAATTAATTTCC		
<i>irp2</i>	1-AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	55	(23)
	2-TCGTGGGCAGCGTTTCTTCT		
<i>shf</i>	1-ACTTTCTCCCGAGACATTC	50	(23)
	2-CTTTAGCGGGAGCATTCAT		
<i>elt</i>	1-TCTCTATGTGCATACGGAGC	52	(54)
	2-CCATACTGATTGCCGCAAT		
SPATE	1-GAGGTCAACAACCTGAACAACGTATGGG	56	(26)
	2-CCGGCACGGGCTGTCACTTCCAG		
<i>stx</i>	1-GAGCGAAATAATTTATATGTG	52	(54)
	2-TGATGATGGCAATTCAGTAT		

^a Marcadores genéticos de virulência: *eae*= *E. coli* “attaching and effacing”, *pAA*= plasmídeo de adesão agregativa, *aggR*= “aggregative adhesion R”, *ipaH*= “invasion plasmid antigen H”, *ial*= “invasion associated locus”, *irp2*= gene da yersiniabactina, *shf*= “open reading frame”, *elt*= gene da enterotoxina LT-I, SPATE= Sequência comum ao gene de várias serina-proteases autotransportadoras, *stx*= sequência comum aos genes das citotoxinas de Shiga (*Stx-1* e *Stx-2*).

bovino (MEM/SFB) e mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂, através de repiques sucessivos realizados periodicamente.

i) Teste de adesão

Para o teste de adesão, as células foram transferidas das garrafas para câmaras acopladas a lâminas de vidro (*Chamber Slides*), num volume entre 0,7 a 1 ml, contendo 10⁵ células/ml e incubadas até a semi-confluência. Nesta condição, o meio de cultura foi desprezado das câmaras e a monocamada de células foi lavada, de 3 a 4 vezes, com PBS. O volume original (0,7-1,0 ml) de meio foi repostado contendo MEM/SFB com 1 % de D-manose. Em seguida, suspensões de 10⁸ células bacterianas/ml de MEM/SFB foram inoculadas em cada câmara, que foi incubada por 3 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Decorrido este período, o meio de cultura foi desprezado, a monocamada lavada com PBS por 3 vezes, fixada com metanol por 20 minutos e corada com giemsa. Ao final do preparo e coloração, o compartimento das câmaras foi retirado, restando as lâminas com a monocamada celular, que foram observadas a microscópio óptico comum. A capacidade de adesão bacteriana foi baseada na análise de 200 células epiteliais, sendo considerada aderente a cepa que nesta área apresentou uma média de pelo menos 1 bactéria/célula. As amostras aderentes foram classificadas quanto ao fenótipo observado (agregativo, localizado e difuso), através de comparação com cepas de referência (respectivamente EAEC-O42, EPEC-E2348/69 E DAEC-LBX).

ii) Teste de Invasão

Preparo da monocamada de células: A partir de culturas em meio de Eagle com 10% de soro fetal bovino (MEM/SFB) em garrafas de poliestireno, as células

foram transferidas, em suspensões de 4×10^5 UFC em volume de 1 ml, para pocinhos de microplacas, as quais foram incubadas em estufa com atmosfera de CO_2 , por 20 horas.

Crescimento das bactérias: Culturas de uma noite em TSB foram transferidas para placas ou tubos de ágar nutriente e cultivadas em tempo suficiente para obtenção da massa de crescimento necessária para o preparo da suspensão utilizada no teste.

Contagem bacteriana: Para semeadura nas monocamadas celulares, foi empregado um número de 4×10^7 células bacterianas (100x o número utilizado no preparo da monocamada). A contagem foi realizada em câmaras de Neubauer, cujo número foi aferido através de cultura do inóculo e contagem de UFC em placas de ágar nutriente. Para a contagem direta (nas câmaras de Neubauer), a partir das culturas acima foram preparadas suspensões bacterianas em 500 μL de salina (0,9%) que foi diluída 500x. A quantificação bacteriana em placas foi feita a partir de uma suspensão obtida pela diluição a 5×10^7 da suspensão inicial, que foi espalhada com alça de Drigalsky, em ágar nutriente e cultivada durante uma noite, para contagem das UFCs.

Infecção, multiplicação bacteriana e lise das células HEp-2: Após a retirada do meio de cultura das placas, a monocamada celular foi lavada de 3 a 5 vezes com PBS e uma suspensão contendo 4×10^7 células bacterianas foi acrescentada. As microplacas foram incubadas em estufa com atmosfera de CO_2 por 3h, o meio retirado e, após secagem e lavagem com PBS por 3 vezes, foi acrescentado MEM/SFB contendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. As microplacas foram novamente incubadas por 1h e, após novo procedimento de lavagem, a monocamada celular foi lisada com 1 ml de triton X-100 a 1% (em água

destilada), durante 5 minutos. Volumes definidos do lisado foram espalhados com alça de Drigalsky em placas de ágar nutriente, sendo estas incubadas por uma noite, para posterior contagem de UFC.

Cálculo da invasibilidade: A capacidade de invasão foi calculada pela determinação da porcentagem das bactérias inoculadas que sobreviveram ao tratamento com gentamicina (bactérias viáveis no lisado). Os resultados foram expressos pela média dos valores obtidos em experimentos realizados de 2 a 4 vezes e em tempos diferentes. Como controles positivo e negativo foram respectivamente usadas as amostras de *E. coli* K12/HB101 e EIEC/EIX.

d) Determinação da Sensibilidade Bacteriana a Drogas

Realizada através do método de difusão em disco, de acordo com as orientações do National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Suspensões bacterianas (na concentração equivalente a escala 0,5 de MacFarland) em solução salina foram espalhadas na superfície de placas de Mueller-Hinton e, após absorção do inóculo pelo ágar (secagem), foram acrescentados os discos contendo concentrações conhecidas de cada droga. As placas foram incubadas por 18 a 24h. Após este período, cada cultura foi observada quando à ocorrência de halos de inibição. O nível de sensibilidade (sensível, resistente ou de sensibilidade intermediária) foi definido pelo tamanho do halo de inibição, em conformidade com a concentração de cada droga e baseado em uma tabela de referência. As seguintes drogas foram utilizadas: ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina. No total, foram

testadas 52 amostras bacterianas, cada uma das quais isoladas de um indivíduo distinto, sendo 5 portadores de DC, 28 portadores de RU e 19 controles.

6. Teste estatístico

O nível de significância nas análises comparativas entre os grupos foi aferido pelo teste de χ^2 , sendo consideradas significativas diferenças com valores de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

1. Variação na Concentração Bacteriana

a) *Bactérias Gram negativas*

Para a quantificação de bactérias Gram negativas, foram analisados materiais clínicos de 14 portadores de DC, 17 de RU e 26 controles. Os materiais clínicos consistiram de fezes e biópsias de diferentes regiões da mucosa, (desde o íleo até o cólon sigmoide). De cada indivíduo, além das fezes, coletou-se de 2 a 4 biópsias de locais distintos da mucosa intestinal (uma biópsia por sítio de coleta de cada indivíduo). Os locais de coleta corresponderam a sítios de lesões. Nos controles, os pontos de coleta não apresentaram sinais visíveis de lesões. Para cada biópsia destinada ao cultivo bacteriano de uma determinada área de tecido, coletou-se outra do mesmo local, para análise histopatológica. Deste modo, a classificação do material como sendo de paciente com DC, RU ou Controle foi baseada em informações clínicas, dados de colonoscopia e análise histopatológica. A tabela 3 apresenta o número dos diferentes tipos de material clínico utilizado para quantificação bacteriana em cada grupo de pacientes.

Os gráficos das figuras 2 e 3 apresentam os valores médios, bem como o desvio padrão, da concentração bacteriana encontrada em cada material clínico, para os três grupos de indivíduos estudados. A figura 2 mostra que, comparada aos controles, a concentração média de bactérias Gram negativas no ceco de portadores de DII, particularmente em pacientes com DC, foi menor do que em controles. Por outro lado, no cólon terminal (descendente e sigmoide) de

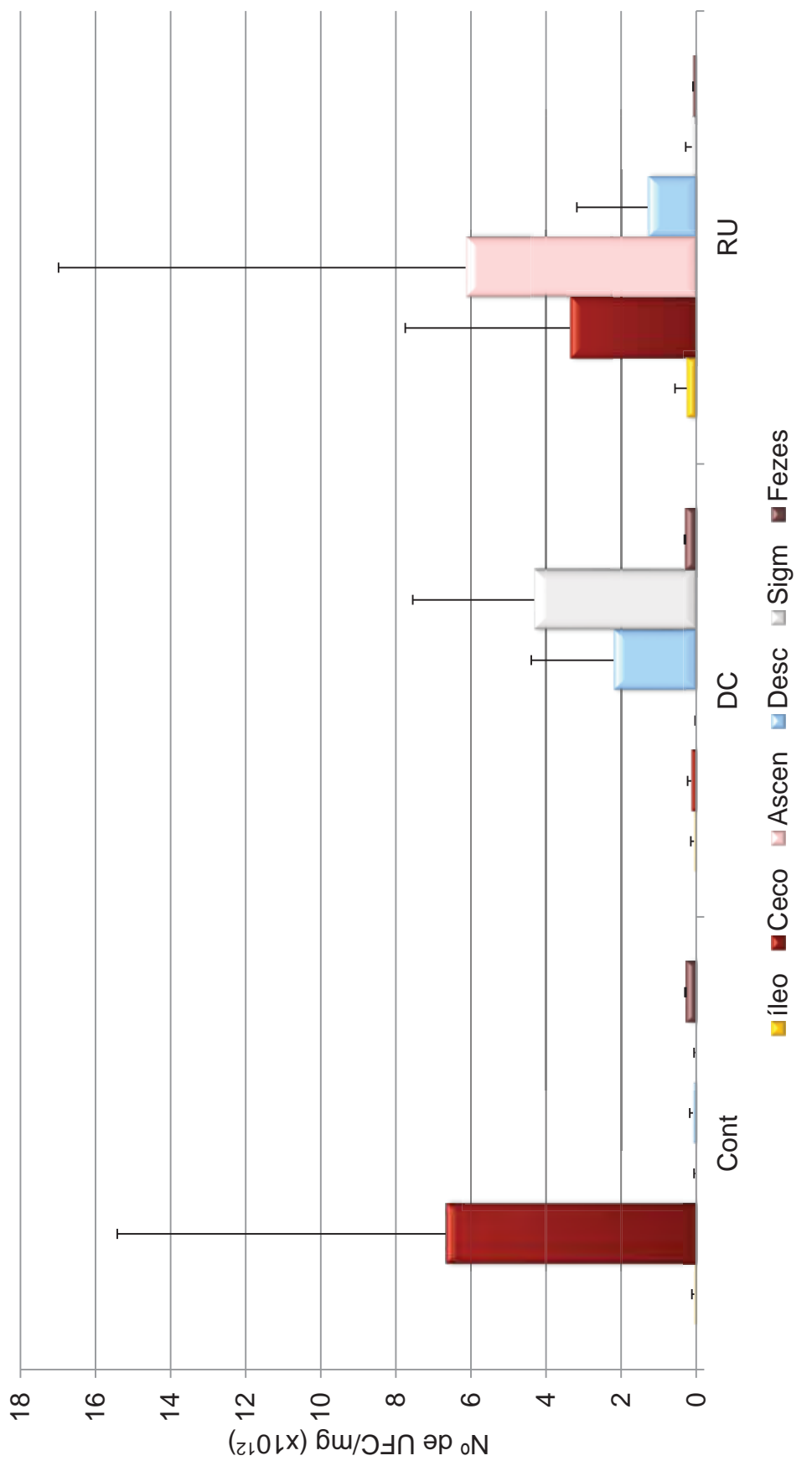
Tabela 3. Número e natureza dos materiais clínicos utilizados para quantificação bacteriana em cada grupo de paciente

Grupo *	Biópsia de**					Fezes	Total
	íleo	Ceco	Ascen	Desc	Sigm		
Cont	9	3	13	7	10	12	54
DC	7	2	6	2	3	4	24
RU	9	5	10	8	5	6	43
Total	25	10	29	17	18	22	121

* Grupos: Cont, controle; DC, Doença de Crohn; RU, Retocolite ulcerativa

** Asc, Cólon ascendente; Desc, Cólon descendente; Sigm, Cólon sigmoide

Figura 2. Concentração bacteriana média em diferentes segmentos do intestino de portadores de DII e controles, a partir de crescimento em meio de MacConkey



pacientes com DC, no íleo, no cólon ascendente e descendente de portadores de RU, verificou-se um aumento na concentração destas bactérias. A figura 3 apresenta o resultado da variação na concentração microbiana, descontado o total de bactérias Gram negativas. Observando-se esta figura, verifica-se que, do mesmo modo que aconteceu para bactérias Gram negativas, houve um aumento de outros grupos microbianos (que crescem no meio TSA) no cólon terminal de pacientes com DC. Nestes pacientes, o aumento destes grupos também foi verificado no íleo. Estes microrganismos, além de diferentes classes de bactérias Gram positivas, podem incluir leveduras e fungos. No caso de portadores de RU, o aumento na concentração média destes microrganismos foi observado numa extensão maior do intestino (desde o íleo até o cólon sigmoide).

b) Aeróbios/Facultativos e Anaeróbios

Um total de 14 indivíduos (4 com DC, 3 com RU e 7 controles) do grupo acima tiveram suas biópsias e fezes analisadas também quanto à presença de anaeróbios (crescimento em condições anaeróbias em ágar Wilkins-Chalgren), *E. coli* e microrganismos totais (crescimento aeróbio em ágar sangue). A figura 4 mostra que, no caso das fezes, a variação na concentração bacteriana foi inversa à observada nas biópsias, conforme mostrado acima: Pacientes com DII apresentaram nas fezes uma menor concentração bacteriana média para todos os grupos pesquisados.

A tabela 4 mostra a relação da concentração destas bactérias entre casos e controles, para diferentes sítios de mucosa. Em alguns casos, os dados apresentados nesta tabela estão em aparente conflito com os mostrados das figuras 2 e 3. É o caso dos valores obtidos das culturas em MacConkey de

Figura 3. Concentração bacteriana média, de portadores de DII e controles a partir de crescimento em TSA, descontado o total de bactérias Gram negativas

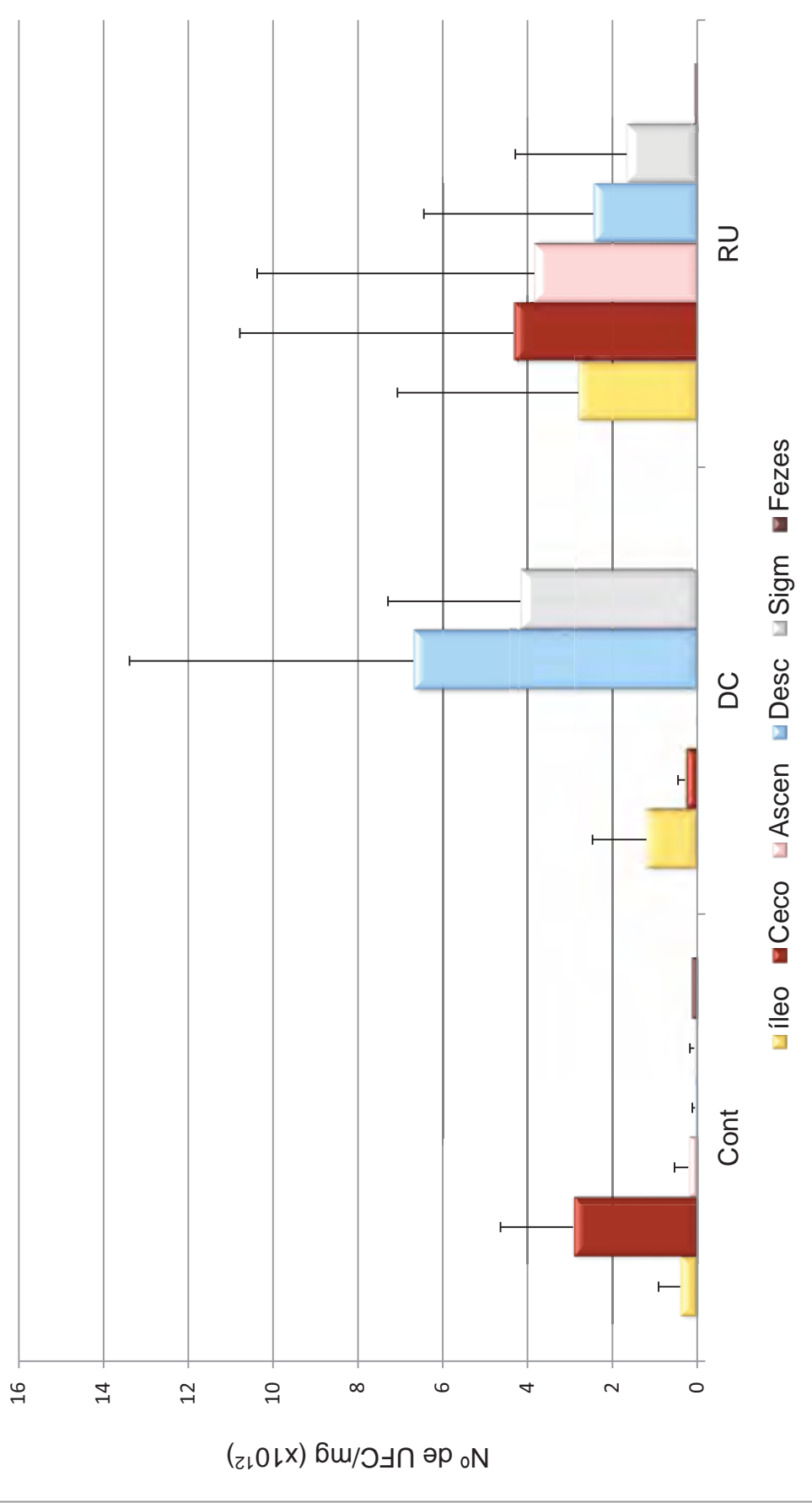


Figura 4. Concentração de bactérias aeróbias/facultativas e anaeróbias nas fezes de portadores de DII e controles

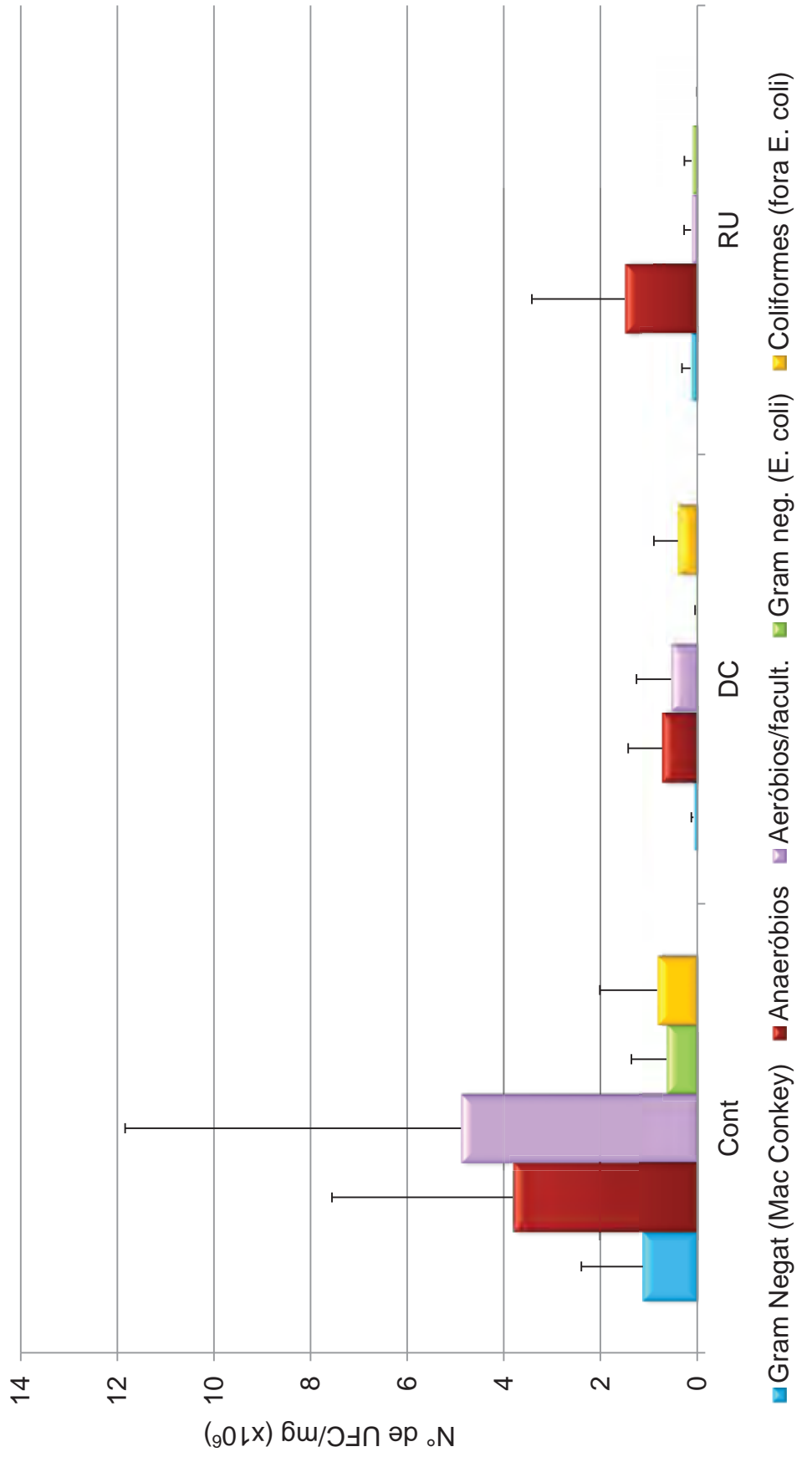


Tabela 4. Variação na concentração de bactérias aeróbias/facultativas e anaeróbias em biópsias intestinais de pacientes com DII em relação à observada em controles ^(a)

Biópsia ^(*)	Grupo ^{(#)(**)}	Cultura em ^(§)				
		MacConk	Wilkins	Á. Sangue	Cromocult	
					<i>E. coli</i>	Outro
Íleo [4]	DC (1)	0,1	1,3	0,6	12,2	NT
	RU (2)	5,3	4,3	3,8	0,4	8,7
Asc [7]	DC (4)	0,1	0,2	0,2	0,1	9,0
	RU (2)	1,7	1,0	1,0	0,8	12,3
Desc [4]	DC (1)	3,9	NT	4,0	3,0	NT
	RU (1)	0,6	0,4	0,6	0,5	NT
Reto [4]	DC (2)	10,3	NT	27,8	26,3	29,0
	RU (0)	NT	NT	NT	NT	NT

^(a) Relação entre valores individuais ou média do n° de UFC/mg de biópsia encontrados em casos sobre os resultados correspondentes de controles (Casos/controles).

^(*) Em colchetes = N° de biópsias analisadas em controles

^(**) Grupos: Cont, controle; DC, Doença de Crohn; RU, Retocolite ulcerativa

^(#) Em parênteses = N° de biópsias analisadas em cada grupo

^(§) NT = Não testado. Números em negrito (<1,0) indicam resultados onde a concentração bacteriana nos pacientes com DII foi menor do que em controles.

biópsias do cólon descendente de portadores de RU. Enquanto que a tabela A mostra um declínio de 40% nas bactérias Gram negativas destas biópsias, a figura 2 mostra um aumento expressivo (>20x), na mesma região. Estas divergências podem ser explicadas pela grande variação observada entre indivíduos o que se reflete em grandes valores de desvios padrão da média. A interpretação dos resultados é também comprometida pelo reduzido número de materiais clínicos analisado. Todavia, os dados parecem indicar que o aumento ou redução destes grupos na microbiota depende da região de mucosa analisada, bem como do tipo de manifestação clínica da DII. Por exemplo, no reto de portadores de DC, observou-se um aumento significativo de todos os grupos bacterianos investigados (tabela 4). Este aumento foi particularmente significativo para Enterobactérias. Em biópsias retais destes pacientes, o crescimento de *E. coli*, de outros coliformes e de microrganismos totais (cultura em ágar sangue), foi quase 30 vezes superior ao observado em controles. Biópsias de portadores de RU não foram analisadas. Mas, observações feitas em culturas visando o isolamento de *E. coli* (item III-3) sugerem uma maior concentração tanto destas bactérias como de outras Gram negativas em portadores de DII (tanto em pacientes com DC – como mostrado na tabela 4 – quanto naqueles diagnosticados com RU). No caso de *E. coli* e outros coliformes, este aumento foi de quase 30 vezes.

2. Propriedades de virulência de *E. coli*

A análise das propriedades de virulência foi direcionada principalmente para a população de *E. coli* encontrada na mucosa do reto (Estudo A, ver tabela 1 página 18). Estas amostras foram submetidas à tipagem por ERIC2 PCR,

pesquisa de marcadores genéticos de virulência, teste de adesão e invasão a células Hep-2 e ao antibiograma.

a) *Diversidade de ERIC-tipos.*

Com base na análise dos dados de ERIC2-PCR, os isolados de *E. coli* da mucosa retal dos três grupos de indivíduos estudados apresentaram uma grande heterogeneidade genética. No conjunto de 44 indivíduos analisados (7 portadores de DC, 21 diagnosticados com RU e 16 controles), não foi detectado nenhum ERIC-tipo de *E. coli* comum ou similar em diferentes indivíduos. ERIC-tipos idênticos só foram encontrados em isolados de um mesmo material clínico de um dado indivíduo. Todas as cepas de um mesmo indivíduo apresentaram ERIC tipos idênticos.

b) *Invasão a células HEp-2*

Tendo em vista a identidade genética entre cepas de um mesmo indivíduo, apenas uma amostra de cada paciente ou controle foi submetida ao teste de invasão. No total de 44 cepas testadas (dos 44 indivíduos referidos no item anterior) em pelos menos 3 repetições, não foi identificada nenhuma *E. coli* invasora (Os valores médios de invasibilidade foram inferiores a 10% daquele obtido para EIEC, cuja invasibilidade, em geral, variou de 0,01 a 1%). Uma das cepas (isolada de uma portadora de RU) apresentou um crescimento em placas de TSA, sugestivo de capacidade invasiva. Todavia, quando submetida à determinação da CIM para gentamicina, se mostrou completamente resistente à droga – um fenótipo raro para *E. coli*. No entanto, análise de preparações do teste, por microscopia eletrônica, revelou a presença de pelo menos uma célula bacteriana intracelularmente (figura 5).

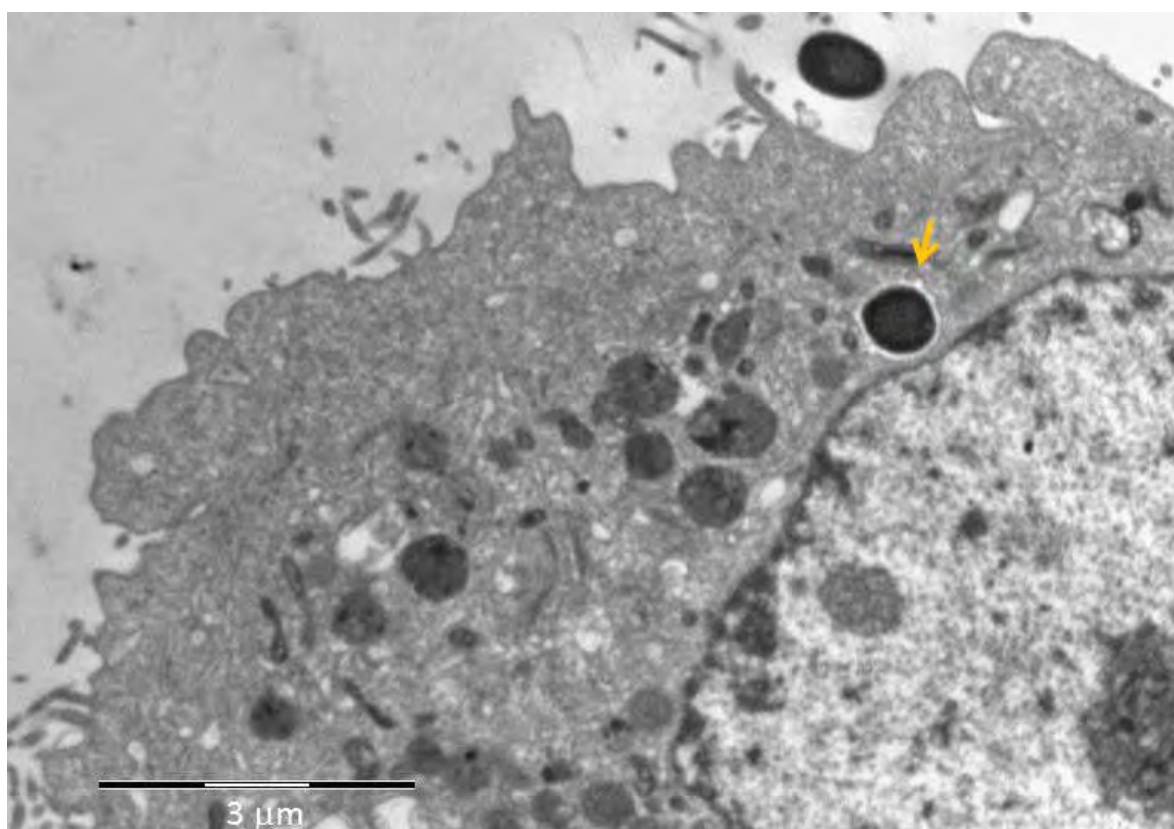


Figura 5. Fotomicrografia eletrônica de uma célula Hep-2, onde se observa intracelularmente (seta) a amostra D013/02 (isolada de um caso de RU).

c) *Adesão a células HEp-2*

O Teste de adesão foi realizado com amostras de *E. coli* de 173 espécimes clínicos de 92 pacientes distintos (39 portadores de RU, 14 diagnosticados com DC e 39 controles).

Comparando a adesão de amostras de *E. coli* pela soma de diferentes materiais clínicos de pacientes com DII (DC+RU) com o total de espécimes correspondentes em controles, observa-se uma maior prevalência de amostras aderentes entre os primeiros. Todavia, quando se analisa a prevalência destas amostras dentro de cada grupo, não se observa diferenças na prevalência de amostras aderentes e não aderentes, tanto no grupo RU, quanto em DC. Por outro lado, quando se analisa os resultados dos controles, observa-se um predomínio bem maior de amostras não aderentes em relação aos controles (tabela 5).

Quando se leva em consideração o tipo de material clínico, observa-se uma alta prevalência de amostras agregativas no reto de portadores de RU (mas não de DC) e um reduzido número de amostras aderentes nas fezes de controles e de portadores de RU (mas não de DC).

d) *Marcadores de Virulência de E. coli diarreiogênicas*

Um total de 162 amostras (31 de 12 portadores de DC, 60 de 25 pacientes com RU e 71 de 35 controles) de *E. coli*, em sua maioria isoladas de biópsias retais, foram submetidas a uma multiplex PCR para detecção dos seguintes marcadores de virulência: *ipaH*, *eae*, *aggR*, *stx* e *elt*, encontrados respectivamente em EIEC, EPEC, EAEC, STEC e ETEC (Figura 6). A tabela 6

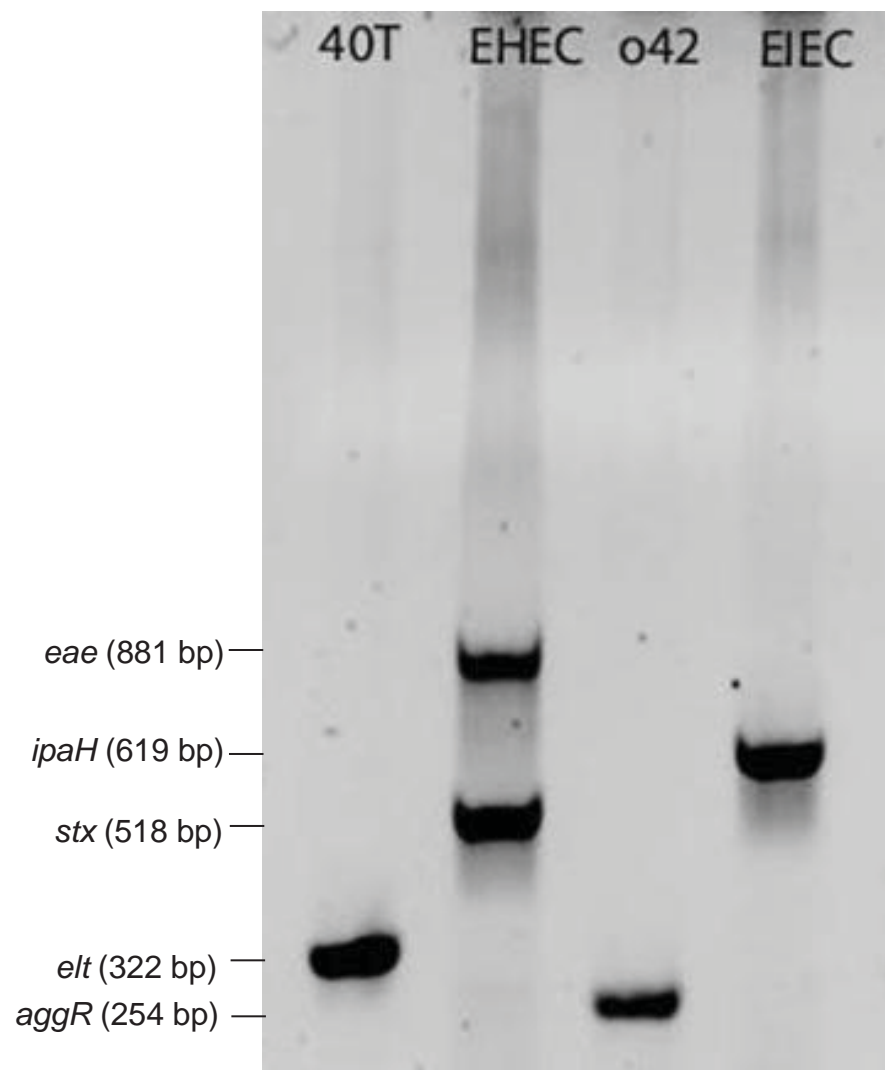


Figura 6. Eletroforese em Gel de agarose de amplicons dos genes *eae*, *ipaH*, *stx*, *elt* e *aggR* encontrados respectivamente em amostras de EHEC/EPEC, EIEC, STEC, ETEC e EAEC. A PCR foi feita a partir de lisados bacterianos das amostras de referência (identificadas nas canaletas).

Tabela 5. Distribuição de *E. coli* com fenótipos de adesão específicos (a células HEp-2), por sítio da mucosa ou fezes em cada grupo de paciente ^{(a)/(b)/(c)}

Material Clínico ^(§)	DC			Cont			RU			Total
	AA	AD	NA	AA	AD	NA	AA	AD	NA	
Asc	1 (5)	0	2 (10)	2 (10)	0	5 (24)	4 (19)	0	7 (33)	21
Ceco	1 (6)	0	2 (13)	2 (13)	0	4 (15)	3 (19)	0	4 (25)	16
Desc	1 (7)	0	0	0	0	2 (13)	3 (20)	0	9 (60)	15
Fezes	2 (14)	0	1 (7)	1 (7)	0	3 (21)	1 (7)	0	6 (43)	14
Íleo	1 (7)	0	3 (21)	0	0	2 (14)	2 (14)	0	6 (43)	14
Reto	6 (9)	2 (3)	2 (3)	5 (7)	4 (6)	17 (25)	18 (27)	2 (3)	11 (16)	67
Sigm	1 (4)	1 (4)	4 (15)	1 (4)	2 (8)	11 (25)	2 (8)	2 (8)	22 (8)	26
Total (%)	13 (7,5)	3 (1,7)	14 (8,1)	11 (6,4)	6 (3,5)	44 (25,4)	33 (19,1)	4 (2,3)	45 (26)	173

^(a) N° (%) de espécimes positivas

^(b) Grupos: DC, Doença de Crohn; Cont, controle; RU, Retocolite ulcerativa

^(c) Padrões de adesão: AA, adesão agregativa; AD, adesão difusa; NA, Não aderente

^(§) Asc, Cólon ascendente; Desc, Cólon descendente; Sigm, Cólon sigmóide.

mostra a prevalência de pacientes com DII e controles em que foram encontradas *E. coli* positivas para estes marcadores. No geral, amostras dotadas destes marcadores de virulência foram mais frequentemente encontradas nos portadores de DII ($p < 0,05$). Esta maior prevalência é particularmente significativa em pacientes diagnosticados com RU. Amostras positivas para *stx* e *ipaH* foram encontradas apenas em portadores de DII. O gene *stx* foi detectado em amostras de 2 pacientes com RU e 1 com DC. Neste último, uma amostra positiva foi encontrada nas fezes e outra numa biópsia do íleo (todavia, não foi feita a tipagem, para verificar se as duas cepas são iguais). Uma cepa *stx+* também apresentou o gene *aggR*. A cepa *ipaH+* foi isolada no cólon de um portado de DC (tabela 6)

e) *Genes de virulência em Amostras de E. coli agregativas*

Considerando-se a alta prevalência de *E. coli* agregativas nos pacientes com DII estudados, além da PCR para os genes referidos acima, todas as amostras de *E. coli* que expressaram o padrão AA e as não aderentes (NA) isoladas de biópsias retais foram submetidas a PCR para SPATE, *shf*, e *irp2*, e *pAA* (marcadores de virulência, comumente encontrados em EAEC). No conjunto, 67 amostras bacterianas AA+ e 34 NA, isoladas entre 2002 e 2006 (Estudo A), de casos de RU, DC e controles foram testadas (tabela 7). Com exceção dos genes *ipaH*, *ial* e *elt*, que não foram identificados em nenhuma destas amostras AA+, pelo menos um dos demais foi detectado em alguma das amostras pesquisadas. Enquanto que, em controles, não se observou diferença entre amostras NA e AA, quanto à prevalência dos genes encontrados ($p = 0,79$),

em portadores de doença inflamatória intestinal, a prevalência destes genes foi maior em amostras AA+ do que nas NA ($p < 0,00002$ para RU e $p = 0,009$ de DC).

f) Perfil de Sensibilidade a Drogas

Um total de 52 amostras bacterianas, cada uma das quais isoladas (de biópsias retais) de indivíduos diferentes, foi submetido à determinação da sensibilidade a drogas pelo método de difusão em disco. No total, foram testadas 5 drogas (ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina). Mais da metade das amostras isoladas tanto de portadores de DC, quanto de Controles mostraram-se sensíveis a todas as drogas testadas. Por outro lado, entre os pacientes com RU, mais de 60% dos indivíduos apresentaram amostras resistentes a pelo menos uma destas drogas. Cinquenta por cento (14/28) dos portadores de RU apresentaram amostras resistentes à tetraciclina. Já entre os controles, a maioria das amostras foi resistente à ampicilina. Os perfis de sensibilidade do conjunto de amostras testadas são apresentados na tabela 8.

Tabela 6. Prevalência de indivíduos nos quais foram detectadas *E. coli* positivas para marcadores genéticos típicos de ECD
(a)(b)

Grupo ^(**)	Marcadores de Virulência ^(*)					Total
	<i>aggR</i>	<i>eae</i>	<i>elt</i>	<i>ipaH</i>	<i>stx</i>	
Cont	3 (9)*	3 (9)	2 (6)	0	0	35
DC	1 (8)	2 (17)	0	1 (8)	1 (8)	12
RU	6 (24)	8 (32)	0		2 (8)	25
Total	10	13	2	1	3	72

(a) N° (%) de indivíduos

(b) Detecção por PCR em isolados bacterianos de diferentes materiais clínicos

(*) Marcadores genéticos de virulência: *eae*= *E. coli* “attaching and effacing”, pAA= plasmídeo de adesão agregativa, *aggR*= “aggregative adhesion R”, *ipaH*= “invasion plasmid antigen H”, *ial*= “invasion associated locus”, *irp2*= gene da yersiniabactina, *shf*= “open reading frame”, *elt*= gene da enterotoxina LT-I, SPATE= Seqüência comum ao gene de várias serina-proteases autotransportadoras, *stx*= seqüência comum aos genes das citotoxinas de Shiga (Stx-1 e Stx-2).

(**) Grupos de pacientes: Portadores de: DC, Doença de Crohn; RU, Retocolite ulcerativa e Cont, controles

Tabela 7. Marcadores genéticos de virulência encontrados em amostras de *E. coli* expressando o padrão AA e em amostras não aderentes a células HEp-2.

Adesão	Grupo ^(*)	Marcador (es) ^(**)
AA (67)	RU [42] ^a	<i>irp2</i> , SPATE (14) ^b
		<i>shf</i> , <i>irp2</i> , SPATE (6)
		<i>eae</i> , <i>irp2</i> , SPATE (6)
		<i>irp2</i> (2)
		<i>irp2</i> , <i>pAA</i> , <i>aggR</i> , SPATE (2)
		SPATE (2)
		<i>shf</i> , <i>irp2</i> (1)
		<i>aggR</i> , SPATE (1)
		<i>eae</i> , <i>irp2</i> (1)
		<i>eae</i> , <i>shf</i> , <i>irp2</i> , SPATE (1)
		<i>shf</i> (1)
		<i>shf</i> , <i>irp2</i> , <i>aggR</i> , <i>pAA</i> (1)
	<i>shf</i> , <i>irp2</i> , <i>pAA</i> , SPATE (1)	
	DC [12]	<i>irp2</i> , SPATE (5)
		SPATE (3)
<i>eae</i> , SPATE (3)		
<i>irp2</i> (1)		
Cont [13]	<i>irp2</i> , SPATE (3)	
	<i>shf</i> , <i>irp2</i> , SPATE (2)	
	<i>irp2</i> (1)	
	SPATE (2)	
NA (34)	RU [18]	<i>irp2</i> (2)
		<i>eae</i> , SPATE (1)
		<i>shf</i> , <i>irp2</i> , SPATE (1)
	DC [4]	<i>irp2</i> , SPATE (1)
		SPATE (1)
	Cont [12]	<i>irp2</i> , SPATE (2)
		<i>shf</i> , <i>irp2</i> , SPATE (1)
		<i>irp2</i> (3)
		<i>shf</i> , <i>irp2</i> (2)

(*) Marcadores genéticos de virulência: *eae*= *E. coli* “attaching and effacing”, *pAA*= plasmídio de adesão agregativa, *aggR*= “aggregative adhesion R”, *ipaH*= “invasion plasmid antigen H”, *iat*= “invasion associated locus”, *irp2*= gene da yersiniabactina, *shf*= “open reading frame”, *elt*= gene da enterotoxina LT-I, SPATE= Seqüência comum ao gene de várias serina-proteases autotransportadoras, *stx*= seqüência comum aos genes das citotoxinas de Shiga (Stx-1 e Stx-2).

(**) Grupos de pacientes: Portadores de: DC, Doença de Crohn; RU, Retocolite ulcerativa e Cont, controles

^a Entre colchetes, total da amostras testadas

^b Entre parênteses: N° de amostras portadoras do respectivo gene ou conjunto de genes

Tabela 8. Perfil de sensibilidade a drogas de 52 amostras bacterianas isoladas de um número equivalente de indivíduos ^(a)

Perfil (*)	Grupo (**)			Total
	DC	RU	Cont	
Amp ^R Cpl ^S Clo ^S Gen ^S Tet ^R	1 (20)	8 (29)	1 (5)	10
Amp ^R Cpl ^S Clo ^R Gen ^S Tet ^R	0	2 (7)	0	2
Amp ^R Cpl ^S Clo ^S Gen ^S Tet ^S	0	1 (4)	5 (26)	6
Amp ^S Cpl ^S Clo ^S Gen ^S Tet ^R	1 (20)	3 (11)	2 (11)	6
Amp ^S Cpl ^R Clo ^S Gen ^S Tet ^S	0	1 (4)	0	1
Amp ^S Cpl ^R Clo ^S Gen ^S Tet ^R	0	1 (4)	0	1
Amp ^R Cpl ^R Clo ^S Gen ^S Tet ^S	0	1 (4)	1 (5)	2
Amp ^S Cpl ^S Clo ^S Gen ^S Tet ^S	3 (60)	11 (39)	10 (53)	24
Total	5	28	19	52

^(a) N° (%) de amostras que apresentara cada perfil

^(*) Amp Cpl Clo Gen Tet, respectivamente, ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina

^(**) Grupos de pacientes: Portadores de: DC, Doença de Crohn; RU, Retocolite ulcerativa e Cont, controles

V. DISCUSSÃO

A DII apresenta sintomas de um quadro infeccioso típico, não tendo, porém, um agente causal definido. Múltiplos fatores estão envolvidos e um número crescente de evidências tem assinalado a importância da microbiota intestinal (19). O intestino compreende o nicho mais diversificado e complexo do ser humano e a grande maioria dos microrganismos a ele associados ainda não é conhecida (39). Isto se deve em parte à impossibilidade de cultivá-los em condições artificiais. Variações quantitativas e qualitativas tanto entre microrganismos cultiváveis (19) quanto não cultiváveis (29) têm sido observadas na microbiota de portadores de DII. A predisposição para o desenvolvimento desta doença parece envolver fatores genéticos (8), o que implica em variações entre populações. Até onde se sabe, poucos estudos de avaliação da microbiota de portadores da doença têm sido realizados em portadores de DII no Brasil.

Utilizando um método simples de contagem microbiana, materiais clínicos consistindo de fezes e biópsias da mucosa de diferentes segmentos de intestino de pacientes com DII, atendidos no HC-UNESP em Botucatu foram submetidos à quantificação bacteriana. Em comparação com controles, verificou-se aqui uma variação quantitativa na concentração de bactérias na mucosa e no lúmen (fezes) intestinal destes pacientes. Portadores de DII (RU ou DC) têm uma maior densidade bacteriana do que controles, em vários segmentos da mucosa. Curiosamente, esta variação não foi observada nas fezes. A concentração de bactérias Gram negativas nas fezes de portadores de DC foi equivalente à de controles e a de outros grupos microbianos foi inferior. No caso dos pacientes com RU, as fezes apresentaram redução tanto de bactérias Gram negativas

quanto de outros grupos. Especula-se que esta variação inversa observada entre lúmen e mucosa ocorra porque as bactérias são atraídas e concentram-se nos sítios de lesão na mucosa, o que deve contribuir para o processo inflamatório. Isto acontece, em grande parte devido ao comprometimento da camada de muco (52), que em situação normal eficientemente impede o contato das células epiteliais com as bactérias do lúmen.

Dificuldades por questões éticas comprometeram uma amostragem homogênea. Conforme apresentado na tabela 3, embora o total de espécimes amostrados tenha sido grande (121), houve grandes diferenças no número de amostras de cada sítio de mucosa e de fezes. Do ceco e do cólon descendente de pacientes com DC, por exemplo, foram quantificadas amostras de dois pacientes apenas. Os resultados da análise destas amostras são os apresentados nas figuras 2 e 3. Os dados da tabela 4, demonstrando variação quantitativa pela relação da concentração bacteriana de casos sobre a de controles baseiam-se na análise de um número menor de amostras. Estas limitações, acrescidas de variações naturais entre indivíduos podem explicar os grandes valores de desvios padrões da média observados, bem como algumas inconsistências entre os resultados da tabela 4 com os apresentados nas figura 2, para bactérias Gram negativas.

Não obstante as dificuldades de amostragem, chama a atenção o aumento de Enterobactérias em portadores de DC (tabela 4). No íleo, apesar da análise de uma única amostra, o aumento observado na concentração de *E. coli* coincide com dados da literatura (25), sendo este o sítio onde foi isolada a primeira categoria de *E. coli*, com fortes suspeitas de envolvimento com a doença (40). No caso do reto, a elevação na concentração de *E. coli* e outras Enterobactérias foi

quase de 30x. Amostras de apenas dois pacientes com DC foram quantificadas. Todavia, apesar da pequena amostragem, esta grande diferença parece de fato acontecer, não apenas neste grupo de pacientes, mas também em portadores de RU, tendo por base observações feitas em placas de ágar MacConkey semeadas com biópsias retais, visando a detecção de *E. coli* (item III-3, Estudo A). Enquanto que de 3-5 colônias selecionadas destas placas, nenhuma ou no máximo 2 apresentavam perfis bioquímicos de Enterobactérias, em culturas correspondentes de portadores de DC e de RU, não raro todas as 5 correspondiam ao perfil bioquímico de *E. coli*, *Klebsiella* ou outro gênero da família. Além disto, o aumento de Enterobactérias em pacientes com DII têm sido demonstrado por outros autores (51). No caso de portadores de RU, estes dados adquirem ainda mais significado, quando se considera que 95% dos casos da doença têm o envolvimento do reto (19).

As biópsias analisadas neste trabalho foram coletadas por ocasião de exames colonoscópicos de rotina, de modo que a escolha do local de coleta se baseou estritamente na necessidade do exame pelo paciente. Isto explica o fato de as amostras do estudo realizado entre 2002 e 2006 (Estudo A) consistirem apenas de biópsias retais, o que se justifica pela maior prevalência de lesões nesta região, nestes pacientes. Em estudo realizado posteriormente (2009-2011, Estudo B), em que diferentes espécimes clínicos foram submetidos à quantificação bacteriana (particularmente bactérias Gram negativas), observou-se (com a ressalva dos pontos acima discutidos) uma maior concentração de Enterobactérias e *E. coli* no reto, do que em outros sítios de mucosa. Assim, a coleção de *E. coli* submetida à pesquisa de fatores de patogenicidade é majoritariamente formada de isolados de biópsias retais.

Análise por ERIC2-PCR destas *E. coli* presentes no reto, não mostrou qualquer identidade ou semelhança genética entre as mesmas. Dados da literatura têm relacionado alguns grupos de isolados, definidos por ribotipagem, com a natureza da DC (crônica ou recorrente) (30), mas não uma associação específica de um dado clone ou sorotipo particular com quaisquer das duas variantes clínicas da doença. Assim, aparentemente como verificado aqui por ERIC2-PCR, as amostras de *E. coli* de portadores de DII apresentam-se heterogêneas. Todavia, empregando uma tríplex PCR específica para a classificação das cepas em um dos grupos da coleção de referência de *E. coli* (EcoR), alguns autores (26, 37) demonstraram que estas linhagens pertencem ao grupo B2 ou D, que inclui clones reconhecidamente patogênicos.

Nos casos em que múltiplos isolados de *E. coli* foram detectados em um mesmo indivíduo, eles apresentaram ERIC-tipos idênticos, nos portadores de DII (mas não em controles). Em geral nestes casos, foi comum a uniformidade do aspecto das colônias nas placas de ágar MacConkey. Estas observações sugerem que uma ou poucas linhagens têm a sua proliferação favorecida nestes pacientes. Em razão da semelhança entre os ERIC-tipos dos isolados, a pesquisa de fatores de patogenicidade foi feita em uma única amostra bacteriana de cada paciente.

Não foi detectada nenhuma cepa com capacidade invasora, entre as testadas. Este resultado talvez possa ser explicado pelo local (reto) e o grupo de pacientes (a maioria portador de RU) de onde estas bactérias foram isoladas. A AIEC – único patotipo cujo envolvimento com a DII tem sido claramente demonstrado – coloniza o íleo terminal de portadores de DC (40). O princípio do teste de invasão baseia-se na sensibilidade natural das *E. coli* à gentamicina.

Uma vez que o antibiótico não penetra da célula eucariótica, as bactérias que a invadem ficam protegidas de sua ação. Posteriormente, estas bactérias são recuperadas aplicando-se um tratamento de lise à célula, plaqueamento do lisado e contagem de UFC, após cultivo de uma noite. A invasibilidade é calculada determinando-se a relação entre o número de bactérias inoculadas na preparação sobre o número de UFC recuperado do lisado. Para assegurar-se de sua sensibilidade à ação da gentamicina, as amostras foram submetidas ao antibiograma (item III-5d), não tendo nenhuma amostra apresentado resistência à droga. Feito o antibiograma, as bactérias foram submetidas ao teste de invasão, sendo uma delas recuperada em grande quantidade no lisado. Pelo princípio do teste, ela foi considerada como invasora. Todavia, após a confirmação do resultado, com várias repetições, submeteu-se a amostra à determinação da CIM. Os resultados indicaram que a cepa era resistente à gentamicina. Uma possível explicação é que houve algum erro no teste de antibiograma. Apesar disto, quando preparações de células Hep-2 contendo a amostra foram observadas ao microscópio eletrônico, foi possível a observação da bactéria, em pequeno número, intracelularmente (figura 5). Para se determinar se a cepa é de fato invasora, novos testes serão realizados, substituindo-se a gentamicina por uma droga que seja bactericida para a mesma.

O teste de adesão a células HEp-2 foi realizado em 173 amostras de *E. coli*, em sua maioria isoladas de biópsias retais, mas incluindo isolados de outros segmentos do intestino e de fezes (tabela 5). O teste foi feito em 3h de contato bactéria-célula. No caso do Estudo A, amostras que não aderiram neste intervalo de 3h, foram submetidas a um novo teste, estendendo-se o tempo para 6h. Todavia, bactérias que requerem o tempo de 6h para adesão têm sido

encontradas em prevalência equivalente em casos e controles (46). Além disto, comparação de alguns ERIC-tipos, do conjunto das 173 amostras aqui analisadas, mostraram que aquelas que aderem apenas em 6h assemelham mais com amostras não aderentes do que com aquelas que aderem no tempo de 3h (dados não apresentados).

No conjunto de isolados testados, amostras aderentes a células Hep-2 foram mais prevalentes em casos do que em controles, havendo o predomínio de cepas expressando o padrão de adesão agregativo em pacientes com RU (no reto). Conforme já mencionado, nos sítios de lesão há o comprometimento da camada de muco, deixando as células epiteliais da mucosa vulneráveis à ação das bactérias presentes no lúmen. Experimentos de hibridização *in situ* têm demonstrado que estas bactérias parecem aderir ao muco, indiretamente afetando as células da mucosa (45). Assim, dada sua capacidade de estimular a secreção de muco intestinal, no qual adere formando biofilme (24), não é surpresa a detecção de uma alta concentração de amostras expressando o padrão agregativo em biópsias de lesões destes pacientes. Estas amostras, em geral, diferiram das não aderentes pela maior prevalência de genes de virulência. Entre estes se incluem aqueles que codificam toxinas da família das SPATES, cujo predomínio entre *E. coli* de pacientes de DII já havia sido demonstrado na literatura (26). Algumas SPATES têm atividade de citotoxina, possivelmente afetando as células de mucosa. É o caso de Pet (plasmid encoded toxin), cujo efeito em preparações *in vitro* de intestino humano foi demonstrado por Henderson e colaboradores (18). Outro gene comum em EAEC, encontrado com frequência significativa nestas amostras AA+, foi *irp2*. Este gene está envolvido na produção de um tipo de sideróforo semelhante ao encontrado em espécies de

Yersinia (*yersiniabactina*) (24). Juntamente com *aggR*, *pet* e *irp2* têm sido estatisticamente relacionados com cepas AA+ produtoras de biofilmes (32). Outra sequência comum destas amostras AA+ aqui detectadas foi *shf*, de localização plasmidial e cujo produto não é conhecido. Trata-se de uma ORF críptica, cujo homólogo mais próximo (25% de identidade) é a proteína IcaB de *Staphylococcus epidermidis*, responsável pela adesão intercelular.

Além dos marcadores de EAEC, genes de outras categorias de ECD foram encontrados em maior prevalência em cepas de portadores de DII. É o caso de *stx* e *ipaH*, não detectados em nenhuma amostra de controles. O gene *stx* foi detectado em amostras de dois portadores de RU e um diagnosticado com DC e *ipaH* em uma amostra do cólon de um paciente com DC. O gene *stx* codifica citotoxinas de Shiga, principal fator de virulência de STEC. Uma das amostras dos portadores de RU, além de *stx*, apresentou o gene *aggR*, marcas de virulência detectadas na STEC O104:H4, responsável pelo surto recente de enterite na Alemanha (2). O gene *ipaH* é essencial para a invasibilidade de EIEC, sendo particularmente interessante a sua detecção em uma amostra de um caso de DC, onde estas amostras podem ser mais prevalentes. O gene *elt* (de ETEC) foi detectado amostras de dois controles. Consultando, o prontuário destes pacientes, foi verificado que um deles teve um histórico de sangramento nas fezes e um teve diarreia.

As amostras de *E. coli* caracterizadas neste trabalho foram obtidas a partir de isolamento (semedura por esgotamento) ou diluição de suspensões do material clínico em placas de meio de cultura. Nestas condições, é possível que algumas bactérias contidas nos espécimes clínicos não tenham sido amostradas, podendo os resultados de caracterização aqui obtidos não serem representativos,

em termos qualitativos, do perfil da população de *E. coli* presente. Por isto, é possível, por exemplo, que a prevalência de genes de patogenicidade seja até maior do que a apresentada. Para averiguar esta possibilidade, o esquema de cultura para quantificação bacteriana considerado no estudo B, previu a semeadura da suspensão das amostras em caldos MacConkey antes de sua diluição (ver figura 1).

Entre os três grupos de pacientes, a maior prevalência de cepas resistentes a pelo menos um dos 5 antibióticos testados (ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina) foi observada em portadores de RU (60%x40% de controles). Até onde foi possível pesquisar, poucos trabalhos foram encontrados na literatura referente ao perfil de sensibilidade a drogas de *E. coli* isoladas de pacientes com DII. Um destes trabalhos (50), realizados com amostras de portadores de DC, verificou a sensibilidade de bactérias no interior de macrófagos. O perfil de sensibilidade para ciprofloxacina (99,5%) e tetraciclina (62,8%) foi mais ou menos equivalente ao observado no teste de antibiograma do presente trabalho, para amostras do mesmo grupo de pacientes. Até certo tempo atrás, as conclusões de alguns trabalhos eram carregadas de dúvidas sobre o envolvimento de *E. coli* com a DIII (46). Todavia, os dados obtidos na última década têm reunido evidências suficientes para suspeitar da participação da bactéria, se não na causa, pelo menos na complicação dos sintomas da doença. A maioria destes estudos tem sido realizada com amostras do íleo de portadores de DC, o que tem, entre outras contribuições, possibilitado a identificação e completa caracterização de AIEC.

No presente trabalho, as amostras analisadas foram principalmente de pacientes com RU, particularmente de biópsias retais. O conjunto dos dados

obtidos indica que nestes pacientes há uma proliferação de *E. coli*, com um número significativo de amostras dotadas de fatores de virulência. Boa parte destas amostras parecem consistir de EAEC típicas (*aggR+*) ou atípicas (*aggR-*)(24), que têm como diferencial fatores e estratégias de virulência cuja participação no quadro da DII não parece ilógica (por exemplo, adesão com formação de biofilme ao muco intestinal). Todavia, uma questão intrigante e reiterada nas discussões é se o quadro de doença surge com participação ativa destes fatores bacterianos ou se o que acontece é uma proliferação destas bactérias, como resultado do aparecimento dos sintomas. De qualquer modo, é razoável imaginar que o aumento exacerbado na população bacteriana venha pelo menos contribuir para o agravamento da doença.

VI. 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. **Bielaszewska, M., A. Mellmann, W. Zhang, R. Kock, A. Fruth, A. Bauwens, G. Peters, and H. Karch.** 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect. Dis.* **11**:671-676.
3. **Boudeau, J., N. Barnich, and A. Darfeuille-Michaud.** 2001. Type 1 pili-mediated 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.
4. **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.
5. **Burke, D. A., and A. T. R. Axon.** 1988. Adhesive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea. *BMJ.* **297**:102-104.
6. **Campieri, M., and P. Gionchetti.** 2001. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut.* **48**:132-135.
7. **Cario, E.** 2005. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll like receptors and NOD2. *Gut.* **54**:1182-1193.

8. **Carter, M., and A. Lobo.** 2001. Genes, bacteria and inflammatory bowel disease. *Colorectal Disease*. **3**(sup. 2):2- 6.
9. **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.
10. **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.
11. **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.
12. **Dexreumax, P., and J. Colombel.** 2003. Intestinal flora and Crohn's disease. *Ann. Pharm. Fr.* **61**:276-281.
13. **Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, and D. A. Relman.** 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora.(Reports). *Science*. **308**:1635-1638.
14. **Fiocchi, C.** 1998. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. **115**:182-205.
15. **Fiocchi, C.** 1998. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. **115**:182-205.

16. **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.
17. **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.
18. **Henderson, I. R., S. Hicks, F. Navarro-Garcia, W. P. Elias, A. D. Philips, and J. P. Nataro.** 1999. Involvement of enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in causing human intestinal damage. *Infect. Immun.* **67**:5338-5344.
19. **Hendrickson, B. A., R. Gokhale, and J. H. Cho.** 2002. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:79-94.
20. **Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cézard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou, and G. Thomas.** 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* **411**:599-603.
21. **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.

22. **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.
23. **Kahali, S., B. Sarkar, K. Rajendran, J. Khanam, S. Yamasaki, R. K. Nandy, S. K. Bhattacharya, and T. Rhamamurthy.** 2004. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4111-4120.
24. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev Microbiol.* **2**:123-140.
25. **Keighley, M. R., Y. Arabi, F. Dimock, D. W. Burdon, R. N. Allan, and J. Alexander-Williams.** 1978. Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut.* **19**:1099-1104.
26. **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.
27. **MacDonald, T. T.** 1994. Inflammatory bowel disease in knockout mice. *Curr. Biol.* **4**:261-263.
28. **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.
29. **Martinez-Medina, M., X. Aldeguer, F. Gonzalez-Huix, D. Acero, and L. J. Garcia-Gil.** 2006. Abnormal microbiota composition in the ileocolonic

- mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflamm bowel dis.* **12**:1136-1145.
30. **Masseret, E., J. Boudeau, J. F. Colombel, C. Neut, P. Desreumaux, B. Joly, A. Cortot, and A. Darfeuille-Michaud.** 2001. Genetically related *Escherichi coli* strains associated with Crohn's disease. *Gut.* **48**:320-325.
 31. **Meconi, S., A. Vercellone, F. Levillain, B. Payre, T. A. Saati, F. Capilla, P. Desreumaux, A. Darfeuille-Michaud, and F. Altare.** 2007. Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas *in vitro*. *Cel. Microbiol.* **9**:1252-1261.
 32. **Mohamed, J. A., D. B. Huang, Z.-D. Jiang, H. L. DuPont, J. P. Nataro, J. Belkind-Gerson, and P. C. Okhuysen.** 2007. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J. Clin. Microbiol.* **45**:121-126.
 33. **Mow, W. S., E. A. Vasiliasuskas, Y.-C. Lin, P. R. Fleshner, K. A. Papadakis, K. D. Taylor, C. J. Landers, M. T. Abreu-Martin, J. I. Rotter, H. Yang, and S. R. Targan.** 2004. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology.* **126**:414-424.
 34. **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.

35. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. **11**(1):142-201.
36. **Ogura, Y., D. K. Bonen, N. Inohara, D. L. Nicolaes, F. F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R. H. Duerr, J.-P. Achkar, S. R. Brant, T. M. Bayless, B. S. Kirschner, S. B. Hanauer, G. Nuñez, and J. H. Cho.** 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn`s disease. Nature. **411**:603-606.
37. **Petersen, A. M., E. M. Nielsen, E. Litrup, J. Brynskov, H. Mirsepasi, and K. A. Krogh.** 2009. A phylogenetic group of *Escherichia coli* associated with active left-sided inflammatory bowel disease. BMC Microbiol. **9**:1-7.
38. **Podolsky, D. K.** 2002. Medical progress: Inflammatory bowel disease. New Engl. J. Med. **347**:417-429.
39. **Rhodes, J. M.** 2007. The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. Gut. **56**:610-612.
40. **Rolhion, N., and A. Darfeuille-Michaud.** 2007. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. Inflamm. Bowel Dis. **13**:1277-1283.
41. **Rutgeerts, P., M. Peeters, M. Hiele, G. Vantrappen, F. Penninx, R. Aerts, R. Kerremans, and K. Goboos.** 1991. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. Lancet. **338**:771-774.
42. **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.
43. **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.
44. **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.
45. **Schultsz.** 1999. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology.* **117**:1089-1097.
46. **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.
47. **Schumacher, G., H. Steinruck, A. Geyid, B. Kollberg, and A. Ljungh.** 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.
48. **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.

49. **Souza, M. H. L. P., L. E. A. Troncon, C. M. Rodrigues, C. F. G. Viana, P. H. C. Onofre, R. A. Monteiro, A. D. C. Passos, A. L. C. Martinelli, and U. G. Meneghelli.** 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.
50. **Subramanian, S., C. L. Roberts, C. A. Hart, H. M. Martin, S. W. Edwards, J. M. Rhodes, and B. J. Campbell.** 2008. Replication of colonic Crohn's disease mucosal *Escherichia coli* isolates within macrophages and their susceptibility to antibiotics. *Ant. Ag. Chem.* **52**:427-434.
51. **Swidsinski, A., A. Ladhof, A. Pernthaler, S. Swidsinski, V. Loening-Baucke, M. Ortner, J. Weber, U. Hoffmann, S. Schreiber, M. Dietel, and H. Lochs.** 2002. Mucosal flora in Inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* **122**:44-54.
52. **Swidsinski, A., V. Loening-Baucke, F. Theissig, H. Engelhardt, S. Bengmark, S. Koch, H. Lochs, and Y. Dörffel.** 2004. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut.* **56**:343-350.
53. **Tabaqchali, S., D. P. O'donoghue, and K. A. Bettelheim.** 1978. *Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* **19**:108-113.
54. **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.

55. **Tysk, C., E. Lindberg, G. Järnerot, and B. Flodérus-Myrhed.** 1988. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut.* **29**:990-996.
56. **Versalovic, J., M. Schneider, F. J. Bruijn, and J. R. Lupski.** 1994. Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. *Meth. Molec. Cellular Biol.* **40**:5-25.
57. **Victoria, C. R., L. T. Sasaki, and H. R. Nunes.** 2009. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases in midwestern of Sao Paulo State, Brazil. *Arq. Gastroenterol.* **46**:20-25.
58. **Wallace-Gadsden, F., J. R. Johnson, J. Wain, and I. N. Okeke.** 2007. Enteroaggregative *Escherichia coli* related to uropathogenic clonal group A. *Emerg. Infect. Dis.* **13**:757-760.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 CAMPUS DE BOTUCATU
 HOSPITAL DAS CLÍNICAS - FACULDADE DE MEDICINA

PROTÓCOLO DE COLETA DE DADOS - Estudo E. coli

Data: ___/___/___

Nome: _____ RG: _____
 Cidade: _____ DN: ___/___/___ Estado Civil: _____
 Profissão: _____ Escolaridade: _____ Tel: () _____
 Renda Familiar _____ Número de pessoas na casa: _____

1) Controles:

Indicação do exame: _____

2) RCU

LOCALIZAÇÃO: RCU Distal RCU Esquerda Pancolite
 ATIVIDADE: Remissão Leve Moderada Grave

3) Crohn

ATIVIDADE: Remissão Leve Moderada Grave

<p>1. Idade do diagnóstico:</p> <p>() A1 < 16 anos</p> <p>() A2 entre 17 e 40 anos</p> <p>() A3 > 40 anos</p>
<p>2. Localização:</p> <p>() L1 - Ileal</p> <p>() L2 - Colônica</p> <p>() L3 - Iléocolônica</p> <p>() L4 - Doença TGI superior isolada ou associada aos anteriores</p>
<p>3. Compartimento:</p> <p>() B1 - Não estenosante, não penetrante</p> <p>() B2 - Estenosante</p> <p>() B3 - Penetrante</p> <p>() P - modificador de doença perianal (é acrescentado a B1-B3 quando houver doença perianal concomitante)</p>

Medicamentos em Uso:

Uso de antibióticos nos últimos 40 dias?

não sim qual? _____
 há quanto tempo? _____

Controles:

diagnóstico endoscópico: _____

2) RCUI:

segmento	grau de atividade endoscópica	grau de atividade histológica
1) ileo	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave
2) ceco	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave
3) ascendente	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave
4) transverso	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave
5) descendente	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave
6) sigmóide	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave
7) reto	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave

3) Crohn:

segmento	grau de atividade endoscópica	grau de atividade histológica
1) ileo	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave
2) ceco	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave
3) ascendente	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave
4) transverso	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave
5) descendente	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave
6) sigmóide	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave
7) reto	() ausente () leve () moderada () grave	() ausente () leve () moderada () grave
fistulas	localização:	
estenoses	localização:	

Aprovação do Comitê de Ética

Projeto Inicial (Estudo A)

unesp

**Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143
e-mail secretária: capellup@fmb.unesp.br
e-mail Presidência: mjbvianna@uol.com.br

Ética

Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 11 de setembro de 2.002

OF.324/2002-CEP
MJBV/asc

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Josias Rodrigues
Departamento de Microbiologia e Imunologia do
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezado Prof. Josias,

De ordem da Senhora Coordenadora deste Comitê de Ética em Pesquisa, informo que o Projeto de Pesquisa "**Caracterização de Escherichia coli isoladas de pacientes com doença inflamatória intestinal (DII)**", recebeu parecer do relator parecer **favorável**, aprovado em reunião de 02/09/2002

Sendo só para o momento, aproveito o ensejo para renovar os protestos de elevada estima e distinta consideração.

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Projeto Final (Estudo B)



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenação: tsarden@fmb.unesp.br



Registado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de dezembro de 2008

Of. 525/08-CEP

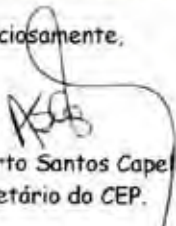
Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Josias Rodrigues
Departamento de Micro/Imuno do
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezado Prof. Josias,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Análise da diversidade bacteriana da microbiota entérica e caracterização das linhagens de Escherichia coli isoladas de pacientes com doença inflamatória intestinal" a ser conduzido por Vossa Senhoria, com a colaboração de: Prof^a Dr^a Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, Prof. Dr. Carlos Roberto Victória, Cristiane M. Thomazini, Fernanda Pedrosa, Juliano Jampietro, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 01/12/2008.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

Termo de Consentimento

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você veio até o Hospital das Clínicas para um exame necessário ao diagnóstico de um problema de saúde. O exame consistirá na introdução de um colonoscópio (sonda) que percorrerá seu intestino, permitindo a avaliação das condições de sua mucosa. Na oportunidade, gostaríamos de convidá-lo a participar de um trabalho de pesquisa (não obrigatório) que tem como objetivo obter algumas informações sobre este problema. A sua participação, que não implica em qualquer forma de indenização ou ressarcimento, consistirá em permitir a coleta de pequenos fragmentos da mucosa (pele do intestino) e/ou fezes para análise por pesquisadores da UNESP. Com base no resultado da análise, você será incluído num grupo definido de estudo. Esclarecemos que o procedimento, que será conduzido sob sigilo e privacidade total, poderá oferecer algum desconforto, e certo grau de risco (como perfuração intestinal), situação em que você terá toda assistência da equipe médica, chefiada pelo Dr. Fernando Gomes Romeiro. No entanto, lembramos que este estudo poderá reverter em benefícios para a população, uma vez que os resultados dele obtidos poderão contribuir para o desenvolvimento de terapias mais eficazes para o controle da doença. Ressaltamos que seu consentimento é livre, podendo optar pela recusa, sem que esta implique em prejuízos em atendimento futuro neste hospital.

A coleta de fragmentos da mucosa intestinal será feita na ocasião do exame colonoscópico, que motivou a vinda do paciente ao hospital, e através de aparelho utilizado para este fim e, de fezes, por solicitação prévia e após devida orientação ao paciente, em tubos coletores apropriados.

Declaro estar ciente dos termos acima e que consinto em participar da pesquisa

Botucatu, ____ / ____ / ____

Paciente - RG:

Dr. Fernando Gomes Romeiro – CRM 111.924

Josias Rodrigues
Responsável pelo projeto

Obs.: Este documento deve ser assinado em duas vias, sendo uma destinada ao paciente e outra aos pesquisadores

Pesquisador Responsável: Josias Rodrigues. email: josias@ibb.unesp.br