



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



“DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE BACTERIANA EM
CULTURAS DE CALDO MACCONKEY DE MATERIAIS
CLÍNICOS DE PORTADORES DE DOENÇA DE CROHN E
ANÁLISE DE PROPRIEDADES DE ISOLADOS DE
ESCHERICHIA COLI IDENTIFICADOS”

VANESSA RAFAELA DE CARVALHO

BOTUCATU - SP

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

"DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE BACTERIANA EM
CULTURAS DE CALDO MACCONKEY DE MATERIAIS
CLÍNICOS DE PORTADORES DE DOENÇA DE CROHN E
ANÁLISE DE PROPRIEDADES DE ISOLADOS DE
ESCHERICHIA COLI IDENTIFICADOS"

ALUNA: VANESSA RAFAELA DE CARVALHO

ORIENTADOR: JOSIAS RODRIGUES

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

BOTUCATU – SP

2016

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

Carvalho, Vanessa Rafaela de.

Determinação da diversidade bacteriana em culturas de caldo MacConkey de materiais clínicos de portadores de doença de Crohn e análise de propriedades de isolados de *Escherichia coli* identificados / Vanessa Rafaela de Carvalho. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Josias Rodrigues

Capes: 20202008

1. *Escherichia coli* - Genética. 2. Biofilme. 3. Meios de cultura (Biologia). 4. Tipagem molecular. 5. Crohn, Doença de.

Palavras-chave: Biofilme; *Escherichia coli*; Tipagem molecular.

Dedicatória

*Aos meus pais, **Antônio e Benedita**,
que muitas vezes renunciaram
seus sonhos para realização
dos meus.*

*Ao meu irmão **Vando**,
de quem tenho muito orgulho
e é meu exemplo.*

*Vocês são meus alicerces,
Amo vocês!*

***“Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez.”**
(Jean Cocteau)*

Agradecimentos

Agradeço à **Deus**, pela graça de ter me permitido concluir este trabalho, pelo dom da vida e pelas oportunidades dos meus caminhos trilhados.

Aos **meus pais** e meu **irmão** por conduzirem minha formação, priorizando e apoiando meus estudos. Obrigada por estarem sempre presentes em minha vida, pela paciência que tiveram durante em todos os momentos difíceis e pelo amor incondicional. Os principais responsáveis pelo meu sucesso. Nada disso seria possível, sem vocês ao meu lado!

Ao meu orientador **Dr. Josias Rodrigues**, por acreditar que eu era capaz e pela orientação. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos acadêmicos e pessoais, pelas palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Obrigada pelas contribuições ao meu futuro profissional. Eu serei eternamente grata por abrir as portas deste laboratório, ter me acolhido durante a minha graduação e ter confiado em mim para conduzir os nossos experimentos. Tenho orgulho em dizer que um dia fui sua orientada. Muito obrigada! - *“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.” (Cora Coralina)*

Ao Dr. **Fernando Romeiro** e Dr^a. **Ligia Sassaki**, pela fundamental colaboração no nosso trabalho.

Aos amigos do **Laboratório de Bacteriologia Médica**, especialmente **Carol e Thaisy**, por terem me ajudado a enfrentar os momentos mais difíceis e ao mesmo tempo, por fazer eu me sentir tão bem no laboratório. E a todos que passaram pelo laboratório (Helton, Rogéria, Luiz, Gabi, Rie, Ana Flávia, Luan e Vinicius) pela convivência e aprendizados.

Aos **funcionários e técnicos** do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNESP de Botucatu, especialmente à secretária **Ana** e aos técnicos **Larissa, Ivana e Luiz**, pela assistência e eficiência.

À Universidade Estadual Paulista (**UNESP**), ao **Instituto de Biociências** de Botucatu e **todos os professores** que contribuíram em minha formação profissional e pessoal, muito obrigada!

Aos Professores **João Pessoa** e **Valber Pedrosa** pelos ensinamentos, contribuições e palavras amigas, me incentivando a acreditar que tudo daria certo. – *“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar.”* (Esopo)

Aos membros da **banca de qualificação**, **Prof. Dr. Silvio Luiz** e **Prof. Dr. Eduardo Bagagli**, pelos valorosos conselhos e sugestões para a melhoria dessa dissertação.

Aos meus ex-colegas de trabalho da **Seção de Recursos Humanos** do Instituto de Biociências, (**Silvia, Eloiza, Julia, Juliana, Elisabete, Élida e Daniel**), pela convivência diária durante os dois anos, por todo carinho, amor, apoio e incentivo aos meus estudos. Obrigada por torcerem por mim e pela contribuição da realização desta dissertação. Se hoje me tornei a pessoa que sou, também devo isso a vocês, Família RH! – *“Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão.”* (Chico Xavier)

Aos meus atuais colegas de trabalho do **Departamento de Proteção Vegetal** da Faculdade de Ciências Agronômicas, em especial, a minha chefe **Silvia Renata** pelo apoio da continuidade dos meus estudos e pela confiança em meu trabalho.

À todos os funcionários da seção de **Pós-Graduação** do Instituto de Biociências, em especial **Luciana e Davi**, pelo total profissionalismo e em particular, pela paciência comigo.

Às minhas **amigas eternas: Maria, Paula, Tainá, Carol, Vivi e Jéssica**, pela amizade de anos, por todos os conselhos, alegrias e choros compartilhados, enfim, por todos os momentos vividos juntos. Obrigada por estarem ao meu lado dando força e apoio! E com certeza, juntas somos mais fortes!

Epígrafe

*“A mente que se abre a uma nova
idéia jamais volta ao seu
tamanho original.”*
(Albert Einstein)

Resumo

Desequilíbrio na composição de espécies bacterianas (disbiose) do intestino é uma característica da doença de Crohn (DC), a mais grave das doenças inflamatórias intestinais (DII). Na disbiose da DII, há um aumento de certos grupos de bactérias, tais como as Proteobacteria, em alguns pacientes. Acredita-se que o aumento destas bactérias deve contribuir para as reações inflamatórias responsáveis pelas lesões observadas no intestino de portadores de DC e retocolite ulcerativa, ao estimular a produção de citocinas por células locais do sistema imune. Proteobacteria, um dos filos predominantes da microbiota intestinal compreende bacilos gram-negativos, dos quais *Escherichia coli* (*E. coli*) é o mais conhecido. Dada a importância de Proteobacteria como patógeno ou membro da microbiota intestinal residente humana, este trabalho teve dois objetivos: 1) Investigar a ocorrência de variação numérica na população de Proteobacteria na DC e 2) Caracterizar amostras de *E. coli* encontradas nesta população, em relação a propriedades de virulência. Visando o primeiro objetivo, DNA de culturas em caldo MacConkey de diferentes materiais clínicos (fezes e biópsias intestinais) de 8 controles e 9 pacientes com DC foram amplificados com primers para as regiões V6-V8 do gene que codifica a fração 16S do rRNA (16S V6-V8 rDNA) e, em seguida, sequências específicas (representando táxons bacterianos particulares) contidas nos amplicons foram separadas por *temperature gradient gel electrophoresis* (TGGE), definindo perfis de banda que refletem a diversidade bacteriana. O segundo objetivo compreendeu a tipagem dos isolados de *E. coli* destas culturas através da classificação em filogrupos (A, B1, B2 e D) da coleção de referência de *E. coli* (EcoR), a pesquisa de sorogrupos O25 e O83, determinação das propriedades de aderência e capacidade de produzir biofilme. Análise de 32 culturas de 9 portadores de DC e 24 culturas de 8 controles mostrou uma clara diferença no número de bandas nos perfis de TGGE dos amplicons de 16S V6-V8 rDNA. Amplicons de 8 culturas de 9 portadores de DC tinham no máximo 2 bandas, ao passo que o número de bandas em amplicons de controles tinham pelo menos 3 bandas. Uma das bandas dos casos em que havia duas bandas ou a banda única dos perfis de cultura de casos teve a mesma mobilidade do amplicon de *E. coli*, colocado no gel como referência da corrida. PCR para detecção de genes de O25 e O83 demonstraram que estes sorogrupos foram dominantes tanto na população de *E. coli* de portadores de DC como de controles (apenas um paciente controle deu resultado negativo na PCR para ambos sorogrupos). Também, a maioria das cepas de *E. coli*, tanto de casos como de controles pertenceu ao filogrupo B2. Resultados parciais de

testes de adesão em células Hep-2 revelaram que todos os pacientes (controles ou não) apresentaram *E. coli* aderentes, expressando o padrão agregativo. Testes para avaliar a capacidade de formação de biofilme indicaram que isolados de *E. coli* das regiões proximais encontrados em controles produzem biofilme de forma mais intensa do que isolados equivalentes de portadores de DC. Como conclusão, os dados apresentados sugerem que a população intestinal de Proteobacteria em portadores de CD apresenta disbiose, associada com um aumento do número de *E. coli*, uma propriedade que foi determinada por TGGE e confirmada com seqüenciamento de amplicons da região V6, pela técnica Ion Torrent. Por fim, com base nos resultados de tipagem e caracterização bacteriana foi possível observar que amostras tanto de caso como de controles, não houve uma prevalência dos sorogrupos e com base nesse resultado podemos associar que ambos os grupos de estudos freqüentam de forma rotineira o mesmo ambiente hospitalar, podendo indicar um favorecimento na aquisição desses tipos bacterianos. Resultados semelhantes ocorreram com as análises dos sorogrupos, onde apenas o filogrupo D teve prevalência significativa em indivíduos controle. Em relação à produção de biofilme, as amostras encontradas na região proximal do intestino de pacientes controles produzem mais biofilmes do que amostras de portadores de DC da mesma região intestinal, indicando que a parede da mucosa intestinal serve como substrato pode influenciar na formação do biofilme.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; Tipagem Molecular; Biofilme.

Abstract

Imbalance in intestinal bacterial composition (dysbiosis) is a hallmark of Crohn's disease (CD), the most severe of inflammatory bowel diseases (IBD). A characteristic of IBD dysbiosis is the elevation of certain groups of bacteria such as Proteobacteria in some patients. It is believed that the augmented bacteria may contribute for the inflammatory reactions underlying the typical lesions observed in the gut of CD and ulcerative colitis patients, by stimulating the production of cytokines by local cells of the immune system. Proteobacteria, one the most prevalent bacterial phyla of the gut microbiota are Gram negative rods of which *Escherichia coli* (*E. coli*) is the most well-known member. Given the significance of Proteobacteria as pathogens or member of resident gut microbiota, this work had two purposes: 1) to investigate the occurrence of numerical variation in the population of these bacteria in CD and 2) Characterizing *E. coli* isolates found in this population, in search for some virulence associated properties. For the first purpose, DNA from MacConkey broth cultures of distinct clinical materials (stools and gut mucosal biopsies) of 9 CD and 8 control patients were amplified with primers for the V6 and V8 regions of the 16S ribosomal RNA gene (16S V6-V8 rDNA) and distinct gene sequences (representing particular bacterial taxa) within the amplicons were resolved by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE), defining band profiles, which reflect the bacterial diversity. The second objective consisted in phylotyping (determining A, B1, B2 and D phylogroups), serotyping (search for O25 and O83 genes), analyzing the *E. coli* isolates of the cultures for adherence properties and competence to produce biofilm. Analysis of 32 cultures from the 9 CD patients and 24 cultures from 8 control subjects showed a clear case-control difference in the number of bands in the TGGE profiles of the 16S V6-V8 rDNA amplicons. Cultures from 8 of 9 CD patients had at most 2 bands, while the number of bands in the cultures from 7 of the 8 controls subjects had at least 3 bands. One of the two bands found in the cultures from CD patients had the same mobility as *E. coli*, put in the gelas reference for the run. PCR screening for O25 and O83 demonstrated that these serogroups were dominant among the *E. coli* population from both controls and CD patients (only one control subject was negative for each of these O groups). Also, most of *E. coli* isolates from both control and CD patients belonged to the B2 phylogroup. Partial results of bacterial adherence to Hep-2 cells revealed that all patients (controls and CD) had aggregative adherent *E. coli* isolates. Tests to determine the ability to produce biofilm indicated that isolates from the proximal, but not from distal region of the gut or the stools, found in controls were stronger biofilm formers than isolates from equivalent

sites of CD patients. In conclusion, the data presented here reveal that intestinal population of Proteobacteria of CD patients show dysbiosis associated with the elevation of *Escherichia coli* and that this variation can be assessed by TGGE and confirmed by sequencing of amplicons V6 region, the technique Ion Torrent. Finally, on the basis of the bacterial typing and characterization results, was observed that samples of both the case and controls, there was a prevalence of serogroups, based on this result we can associate both study groups frequent routinely the same hospital environment and may indicate a favoring the acquisition of these bacterial types. Similar results occurred with the analysis of serogroups, where only the filogrupo D had a significant prevalence in control subjects. For biofilm production, the samples found in the proximal region of the control patients intestine produce more biofilm than DC bearing samples of the same intestinal region, indicating that the intestinal mucosa serves as a substrate may influence the formation of biofilms.

Key-words: *Escherichia coli*; Molecular typing; Biofilms.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Estrutura antigênica de <i>E. coli</i>	5
Figura 2 - Esquema de formação de biofilme bacteriano.....	6
Figura 3 - Aderência bacteriana em células HEp-2.....	7
Figura 4 - Esquema para a determinação dos grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	9
Figura 5 - Eletroforese perpendicular de Enterobactérias.....	16
Figura 6 - TGGE de amplicons de 16S V6-V8 rDNA de algumas Enterobactérias.....	21
Figura 7 - TGGE de amplicons de 16S V6-V8 rDNA de diferentes materiais clínicos de paciente com DC e controle.....	22
Figura 8 - Gráfico da proporção de sequências de gêneros bacterianos nas culturas de biópsias.....	25
Figura 9 - Gráfico da prevalência dos sorogrupos.....	26
Figura 10 -Gráfico da distribuição de filogrupos EcoR por grupo de pacientes.....	26
Figura 11 - Gráfico da formação específica de biofilme por material clínico.....	27
Figura 12 - Gráfico da formação específica de biofilme por <i>E. coli</i> do grupo controle.....	28

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Informações sobre o número e origem das culturas.....	13
Tabela 2 - Primers e outras informações relativas às PCRs.....	14
Tabela 3 - Perfil bioquímico de <i>E. coli</i>	17

Lista de Siglas e Abreviaturas

adk - Adenilato quinase

BHI- *Brain Heart Infusion*

Co - Controle

DC - Doença de Crohn

DII - Doença inflamatória intestinal

DO - Densidade Óptica

E. coli - *Escherichia coli*

Ecor - Coleção de referência de *Escherichia coli*

FEb - Formação específica de biofilme

fumC - Fumarato hidratase

gyrB - DNA girase

HEp-2 – Human epithelial cells (célula de linhagem derivada de carcinoma de laringe humano)

icd - Isocitrato/isopropilmalato desidrogenase

LB - Luria-Bertani

mdh - Malato desidrogenase

MEM - *Minimum Essential Medium Eagle*

MLST - *Multilocus Sequence Typing*

PBS - Salina tamponada com fosfatos

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

purA - Adenilo succinato desidrogenase

RCUI - Retocolite Ulcerativa

recA- Proteína de ligação do DNA

ST - *Sequence type*

TGGE - *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de Ilustrações	
Lista de Tabela	
Lista de Siglas e Abreviaturas	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Fatores envolvidos na Doença de Crohn	1
1.2. <i>E. coli</i> na Doença de Crohn	3
1.3. A diversidade da microbiota intestinal	3
1.4. Estrutura da <i>E. coli</i> e identificação sorológica	4
1.5. Formação de biofilmes e aderência celular	5
1.6. Grupos Filogenéticos de <i>E. coli</i>	8
1.7. Tipagem molecular por <i>MLST</i>	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Culturas bacterianas	12
3.2. Determinação da diversidade bacteriana	13
3.2.1. Extração do DNA e PCR	13
3.2.2. Preparo do gel e definição do gradiente de temperatura da TGGE	16
3.2.2.1. Preparo do gel	16
3.2.2.2. Definição do gradiente de temperatura usado na TGGE	16
3.3. Isolamento e identificação de <i>E. coli</i>	17
3.4. Tipagem molecular dos isolados de <i>E. coli</i>	18
3.4.1. Determinação de grupos Filogenéticos de <i>E. coli</i>	18
3.4.2. Detecção dos genes <i>wzy</i> e <i>wzx</i> que identificam os sorogrupos O25 e O83	19
3.4.3. <i>MLST</i>	19
3.5. Avaliação da capacidade de aderência dos isolados de <i>E. coli</i>	20
3.5.1. Produção de biofilme	20
3.5.2. Teste de Adesão em células Hep-2	20

3.5.2.1.	Manutenção e preparo das monocamadas de células.....	20
3.5.2.2.	Teste de adesão	20
3.6.	Análises estatísticas.....	21
4.	RESULTADOS	22
4.1.	Diversidade bacteriana.....	22
4.1.1.	Perfil de TGGE de amplicons 16S V6-V8 rDNA de bactérias conhecidas	22
4.1.2.	Disbiose em bactérias gram-negativas na doença de Crohn	22
4.2.	Sorogrupos O25 e O83, filogrupos EcoR e ST.....	24
4.3.	Adesão do isolados de <i>E. coli</i>	27
4.3.1.	Adesão e padrões de adesão em células Hep-2	27
4.3.2.	Produção de biofilme	28
5.	DISCUSSÃO	30
6.	CONCLUSÕES.....	32
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fatores envolvidos na Doença de Crohn

A doença inflamatória intestinal (DII) refere-se a um grupo de doenças que causam inflamações crônicas no trato gastrointestinal que se manifestam como lesões no trato digestivo, podendo trazer desde um simples desconforto até comprometimentos graves, alterando a função do intestino e apresenta um grande desafio na área da Medicina por não ter causas conhecidas referentes ao aparecimento dessa doença.

O termo corresponde, de uma forma geral, à qualquer doença que resulta na inflamação do sistema digestivo, mas, apesar disso, atualmente o termo usado para referir-se a duas doenças bastante conhecidas: doença ou síndrome de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCUI) (Sartor 2006).

A DC e a RCUI são as formas mais comuns de DII e caracterizam-se por inflamação crônica do intestino de etiologia ainda não definitivamente esclarecida. Incidem em todo o mundo, representam sério problema de saúde, atingem pessoas jovens, cursam com recidivas frequentes e admitem formas clínicas de alta gravidade. São doenças que geram repercussões importantes na qualidade de vida (QV) dos portadores (Jewel 1998).

Pesquisas vêm sendo realizadas acerca da epidemiologia da DII e todas elas relatam a existência de uma variação geográfica, o que sugere a influência de fatores ambientais no desenvolvimento da doença. A América do Norte, Reino Unido e o norte da Europa correspondem às áreas de maior incidência, enquanto a Austrália, África do Sul, o centro e o sul da Europa apresentam incidência moderada, e por sua vez, a Ásia, África e América do Sul são consideradas regiões de baixa incidência (Karlinger, Gyorke et al. 2000), (Hovde and Moum 2012).

Embora a prevalência das DII nos países mencionados continue sendo mais baixa em comparação com o norte da Europa e América do Norte, estudos retrospectivos sobre a epidemiologia da DII sugerem que há uma tendência mundial para o aumento de sua incidência, inclusive nos países da América do Sul (Stenson 2001). No Brasil, apesar da falta de dados mais completos sobre a DII, é possível observar um aumento no número de mortes causado por ela nos últimos quinze anos, conforme consta no Registro de Uso dos Sistemas do Datasus (Datasus 2015).

Como explanado anteriormente, a DII apresenta variantes e uma das principais é a DC, que tem como sintomas uma série de lesões que afetam o trato gastrointestinal, frequentemente estendendo-se além da mucosa, podendo atingir a camada muscular e

provocar fístulas. As manifestações clínicas vão depender da gravidade e da extensão da resposta inflamatória, mas geralmente incluem dores abdominais, diarreias, perda de peso e febre (Hendrickson, Gokhale et al. 2002), e pode ocorrer em qualquer idade. O maior número de casos está compreendido entre os 15 e os 30 anos (Hanauer 2006), (Hovde and Moum 2012).

Em relação a influência do sexo na DC, verifica-se uma leve predominância das mulheres comparado aos homens, em uma proporção de 1,1 a 1,8 para sexo feminino, para cada 1 no sexo masculino (Karlinger, Gyorke et al. 2000), (Hanauer 2006), (Hovde and Moum 2012).

No aspecto de influência racial e étnica sobre a prevalência da doença, existem indícios que os indivíduos de raça negra são menos afetados do que os brancos, e a população judaica é considerada de alto risco (Sartor 2006). Por outro lado, os latinos e asiáticos são os menos afetados (Karlinger, Gyorke et al. 2000), (Hanauer 2006), (Cosnes, Gower-Rousseau et al. 2011).

Estudos têm indicado a existência de um padrão de agregação familiar, sugerindo o envolvimento de fatores genéticos na DC, como o histórico familiar positivo, o qual fornece uma predisposição genética de parentes portadores da doença (Fiocchi 2015).

O risco de que um parente em primeiro grau seja afetado durante a sua vida é de cerca de 5% (Friedman and Blumberg 2001), se ambos os progenitores tiverem a doença, cada filho apresenta uma probabilidade de 36% de poder vir a desenvolver a doença (Halme, Paavola-Sakki et al. 2006), enquanto os estudos com gêmeos revelam uma taxa de concordância para a DC de 20 a 50% nos gêmeos monozigóticos e inferiores a 10% para os gêmeos dizigóticos (Halme, Paavola-Sakki et al. 2006), (Cho 2008). Entretanto, diversos outros fatores podem estar relacionados no aparecimento ou na perpetuação da DC, como: fatores imunológicos, cujas células imunológicas se confundem e passam a agredir os tecidos que deveriam proteger, fatores alimentares e ambientais, como tabagismo, consumo excessivo de álcool e uso de contraceptivos orais, porém, ainda são necessários estudos mais concretos sobre a incidência desses fatores relacionados à doença (Baumgart and Carding 2007) (Xavier and Podolsky 2007).

Além disso, há evidências que um desequilíbrio na microbiota intestinal pode acarretar no desenvolvimento do processo inflamatório intestinal, sugerindo que a inflamação crônica parece, paradoxalmente, a ser desencadeada por bactérias pertencente à flora comensal normal, as quais assumem condições ainda desconhecidas. Essa disbiose na microbiota

favorece a redução de alguns grupos bacterianos e aumento de outros, como é o caso da bactéria *Escherichia coli* (Danese, Scaldaferri et al. 2004).

1.2. *E. coli* na Doença de Crohn

A bactéria *E. coli* é caracterizada como uma bactéria gram-negativa, bacilar, não formadora de esporos, podendo ser móvel ou não, anaeróbia facultativa, oxidase negativo e fermentadora de açúcar gerando uma variedade de produtos finais. Ademais, faz parte da família Enterobacteriaceae, Classe Gamaproteobacteria, filo Proteobacteria e tem função importantes na manutenção da homeostasia intestinal (Russo and Johnson 2000); (Croxen and Finlay 2010).

Geralmente é encontrada no meio ambiente e na microbiota intestinal normal de humanos e outros animais de sangue quente, onde mantém uma relação comensal, colonizando o trato gastrointestinal de humanos logo após o seu nascimento (Kaper, Nataro et al. 2004) (Donnenberg and Finlay 2013). É um micro-organismo bem sucedido e o anaeróbio facultativo mais numeroso na microbiota intestinal, no entanto, mesmo *E. coli* comensais podem se tornar patogênicas, quando houver quebra no equilíbrio da relação com o hospedeiro ou quando a bactéria estiver fora do trato gastrointestinal (Kaper, Nataro et al. 2004).

Apesar do potencial de patogenicidade da *E. coli* na DC ainda não ser totalmente conhecido, é de grande relevância a investigação do perfil genético desse micro-organismo em pacientes saudáveis e pacientes portadores da doença.

1.3. A diversidade da microbiota intestinal

O trato gastrointestinal humano abriga uma comunidade diversificada de micro-organismos que incluem um grande número de bactérias anaeróbias. Sendo assim, a suspeita do envolvimento de *E. coli* com a causa da doença é devido à observação do aumento do número destas bactérias nos pacientes (Darfeuille-Michaud, Boudeau et al. 2004).

Para a investigação da diversidade de uma comunidade bacteriana podem ser utilizadas técnicas moleculares com o objetivo de identificar esses micro-organismos através de marcadores moleculares, como por exemplo, a região 16S rRNA, uma vez que este gene apresenta tanto regiões altamente conservadas como variáveis, fornecendo informações taxonômicas em vários níveis de classificação e para distinção entre espécies (Janda; Abbott, 2007).

A técnica de *Temperature Gradient Gel Electrophoresis* (TGGE) tem sido utilizada como uma alternativa para determinar a diversidade genética de comunidades microbianas a partir de amostras clínicas, como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, entre outras, que têm papel fundamental no funcionamento do organismo (Torsvik and Ovreas 2002). Esta técnica se baseia em fragmentos de DNA que apresentam diferenças pontuais em suas sequências, sendo domínios genéticos distintos, e consequentemente, ocorre à migração diferencial no gel de poliacrilamida por eletroforese, pois as moléculas de DNA se dissociam em diferentes graus de temperatura (Alvarez, Espinar et al. 2011).

O estudo de ANDORRÀ *et al.* (Andorra, Landi et al. 2008) demonstrou que esta técnica como sendo a ideal na detecção da diversidade de espécies de bactérias em uma mistura de micro-organismos, desde que estejam em proporções relativas semelhantes. Isto se deve à presença massiva de uma espécie em particular, podendo diminuir as chances de detectar outras espécies menos frequentes, podendo ser uma alternativa para a determinação da diversidade bacteriana em culturas de portadores de DC.

1.4. Estrutura da *E. coli* e identificação sorológica

A sorotipagem é um componente fundamental para caracterização da espécie *E. coli*, já que parte da célula bacteriana é composta de estruturas antigênicas que contribuem para a determinação dos sorogrupos, os quais podem estar associados a síndromes e doenças clínicas, pois se correlacionam com certas linhagens virulentas e grupos específicos de *E. coli*.

Uma das principais contribuições para a caracterização da *E. coli* foi o estabelecimento dos métodos sorológicos proposto por Kauffmann (Kauffmann 1947), onde o mesmo propôs que amostras de *E. coli* fossem identificadas tendo como base seus principais antígenos de superfície (Figura 1), sendo O (somáticos), K (capsulares), H (flagelares) e F (fimbriais).

A composição da parede celular das bactérias gram-negativas apresenta um elemento chamado lipopolissacarídeo, formado por três frações, sendo uma delas o antígeno “O” (cadeia de polissacarídeo situado para o espaço extracelular), cuja composição é extremamente variável entre as bactérias da mesma espécie, o que determina os diferentes sorogrupos de uma mesma espécie (Ferreira & Knöbl 2009)

O antígeno flagelar “H” de natureza proteica, conhecida como flagelina, não é utilizado com frequência na identificação antigênica das cepas de *E. coli*, pois pode ser destruído facilmente quando aquecido a 100°C (Berchieri J. et al. 2009)

Em relação à resistência aos efeitos bactericidas do sistema hospedeiro estão associados os antígenos capsulares “K”, devido à presença do ácido polimérico N-acetilneuramínico. Também existem os antígenos fimbriais “F” (adesinas, pili ou fímbrias) que recobrem a superfície bacteriana e são moléculas de natureza proteica capazes de reconhecer receptores específicos na superfície de células eucarióticas (Barcelos, Talvani et al. 2005).

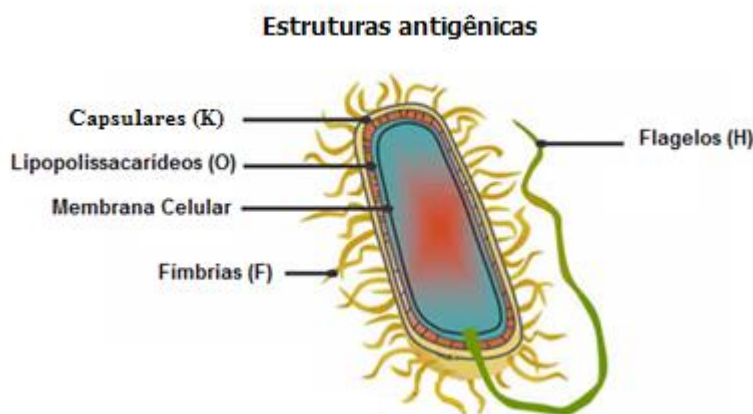


Figura 1. Estruturas antigênicas de *E. coli*. Fímbrias (F) que se aderem às células do epitélio; Capsulares (K) formadas por polissacarídeos e proteínas; Lipopolissacarídeos (O) que são substâncias antigênicas da bactéria; Flagelos (H) que permitem a locomoção bacteriana. Fonte: Adaptado (ECL 2014).

São descritos mais de 180 antígenos somáticos, 100 capsulares e 60 flagelares e provavelmente devido à presença desses antígenos, é possível a identificação sorológica das amostras de *E. coli*, encontrada na microbiota do trato intestinal humano e também amplamente distribuída na natureza, necessitando por isso, fazer-se a diferenciação de amostras patogênicas de não-patogênicas e que venham desenvolver doenças e estabelecer sua correlação (Stenutz, Weintraub et al. 2006).

Os sorogrupos associados à DC são aqueles comumente envolvidos com infecções extra-intestinais, sendo um deles O83. Outro sorogrupo frequentemente associado à infecções hospitalares e também encontrado em pacientes com DC é O25 (Bringer, Rolhion et al. 2007). Ambos estão associados com sinais clínicos e patologias como diarreia, hipotermia, infecções urinárias e até mesmo meningite em crianças recém-nascidas (Croxen & Finlay, 2010).

1.5. Formação de biofilmes e aderência celular

As células bacterianas são dificilmente encontradas na forma isolada, cerca de 90% das bactérias que estão na natureza encontram-se nos chamados biofilmes, denominados como comunidades complexas formadas por micro-organismos aderidos a superfícies bióticas

ou abióticas, envoltas por uma matriz de polissacarídeos e estão associados à persistência bacteriana e a resistência a antimicrobianos. Nos últimos anos, houve um aumento de estudos e pesquisas sobre capacidade de formação de biofilmes, com o objetivo identificar e entender sua formação, principalmente utilizando técnicas moleculares (Costerton, Stewart et al. 1999).

Vários fatores estão implicados no desenvolvimento de um biofilme, tais como: temperatura, presença de agentes antimicrobianos, quantidade de inóculo, características do substrato, variação de pH, disponibilidade de nutrientes e oxigênio, assim como as concentrações dos metabólitos microbianos (Naves, del Prado et al. 2008).

O desenvolvimento do biofilme microbiano em superfícies é um processo dinâmico (Figura 2) que envolve etapas de adesão, crescimento e produção de matriz extracelular. A adesão celular é um processo essencial tanto para a manutenção da microbiota intestinal quanto para a patogênese bacteriana, sendo um passo inicial e pré-requisito para as cepas de *E. coli* colonizarem, com sucesso, a mucosa do hospedeiro e formarem micro-colônias (Weiss-Muszkat, Shakh et al. 2010).

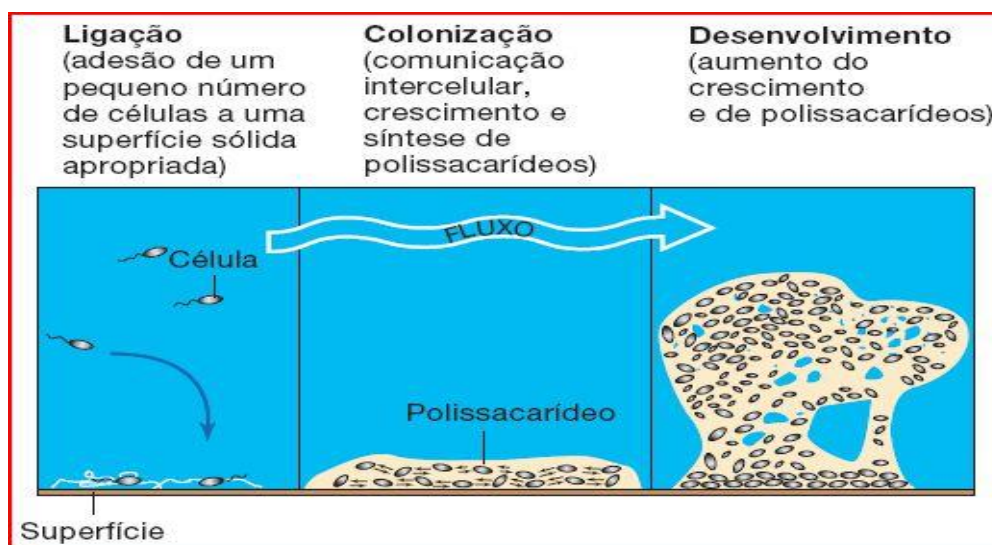


Figura 2. Esquema de formação de biofilme bacteriano. Um biofilme começa quando células isoladas aderem-se a uma determinada superfície. Aderida, a bactéria muda a expressão de diversos genes, perde os flagelos tornando-se imóvel e inicia a produção da matriz. Fonte: Livro (DUNLAP; MADIGAN; et al. 2010)

Quando células bacterianas isoladas aderem-se a uma determinada superfície (normalmente em células epiteliais *in vitro* HEp-2 ou HeLa), são realizados os ensaios de adesão que permitem diferenciar fenotipicamente certas categorias (Figura 3). Além disso, podem ser classificadas em adesão difusa, quando as bactérias cobrem totalmente a superfície celular de modo uniforme; adesão localizada é típica da EPEC (*E. coli* enteropatogênica

clássica) caracterizada por micro-colônias compactadas ou aglomerados de bactérias na superfície de algumas células; adesão agregativa formam-se pontes de bactérias unindo células vizinhas (Torres, Zhou et al. 2005).

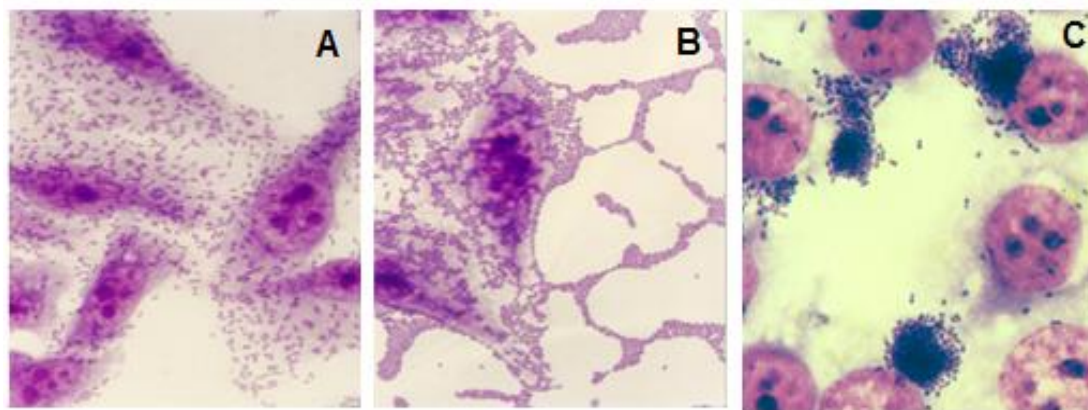


Figura 3. Aderência bacteriana em células HEp-2 (100x). A) Aderência Difusa; B) Aderência Agregativa; C) Aderência Localizada. Aumento de 1000x. Coloração May-Grunwald.

Após esse processo, a bactéria muda a expressão de diversos genes e perde os flagelos tornando-se imóvel, iniciando a produção da matriz dos biofilmes, que apresentam mecanismos de colonização e fixação. Diversas espécies bacterianas vêm sendo estudadas e tendo seu biofilme bem caracterizado quanto às etapas de sua formação, importância do biofilme formado e caracterização dos genes responsáveis pelo estabelecimento do mesmo (Donlan and Costerton 2002).

As bactérias que crescem dentro de um biofilme desenvolvem diferenças fenotípicas, bioquímicas e morfológicas quando comparadas às espécies isoladas, como por exemplo, uma maior resistência a antimicrobianos devido ao fenótipo diferenciado (Hoiby, Bjarnsholt et al. 2010). Devido a essas características conferidas pelo biofilme em situações adversas, tais bactérias podem viver por certo tempo fora do hospedeiro (Pawar, Rossman et al. 2005).

Até o momento, grande parte das doenças infecciosas está sendo tratada eficientemente com antibióticos, entretanto, pesquisas mais recentes mostram que tal tipo de estratégia pode ser ineficaz em duas situações: organismos exibindo resistência inata à droga e em bactérias presentes em biofilme (Ceri, Olson et al. 2010) e quadro ainda mais grave, pois as bactérias existentes nos biofilmes encontram-se mais protegidas contra o sistema imune do hospedeiro (Post, Hiller et al. 2007).

A *E.coli* está dentre as espécies bacterianas mais estudadas relacionadas a produção de biofilmes, devido à presença das fimbrias e os flagelos em sua estrutura bacteriana, que são

responsáveis pela adesão inicial e motilidade, importantes para o estabelecimento do biofilme em superfícies abióticas (Van Houdt and Michiels 2005).

A produção de biofilmes e a capacidade de adesão são consideradas fatores importantes na contribuição da doença no hospedeiro humano, pois correlaciona com a capacidade das bactérias a resistência de antibióticos (Von Baum and Marre 2005) e ao enfraquecimento do sistema imunológico, uma vez que, em situações adversas, essas características conferidas pelos biofilmes fazem minimizar o metabolismo e condições de estresse desses micro-organismos, favorecendo a sua sobrevivência e agravando o quadro da DC (Huang and Dupont 2004); (Harrington, Dudley et al. 2006).

1.6. Grupos Filogenéticos de *E. coli*

A origem evolutiva de *E. coli*, especialmente de isolados extra-intestinais, tem sido estudada pela análise da presença de fatores de virulência em relação à organização populacional desta bactéria (Johnson, Delavari et al. 2001) que são conhecidos como coleção de referência de *Escherichia coli* (Ecor) (Ochman and Selander 1984).

Clermont *et al.* (2000) desenvolveram uma técnica simples e rápida de PCR multiplex para caracterizar os isolados de *E. coli* em grupos filogenéticos baseando-se na presença ou ausência de genes e um fragmento de DNA com sequência não conhecida (TSPE4.C2). Nessa análise filogenética é possível classificar as cepas em quatro grupos principais conhecidos para esta espécie bacteriana, sendo: A, B1, B2 e D, com base na identidade genética utilizando a combinação de alguns genes como *gadA*, *Chua*, *yjaA* e TspE4.C2. (Clermont, Bonacorsi et al. 2000).

As cepas desses quatro grupos diferem entre si em suas características fenotípicas, incluindo a capacidade na utilização de diferentes açúcares, perfil de resistência aos antimicrobianos e temperatura ideal de crescimento. O tamanho do genoma também varia entre os grupos filogenéticos, sendo que cepas dos grupos A e B1 têm o genoma menor que os grupos B2 e D (Bergthorsson and Ochman 1998). Os isolados também diferem de acordo com seus nichos ecológicos e presença de determinados fatores de virulência, com isso, cepas dos grupos B2 e D não são freqüentemente encontradas em amostras ambientais (Walk, Mladonicky et al. 2007).

A presença do gene *chuA* em dada cepa de *E. coli* indica que a mesma pertence a B2 ou D, enquanto a ausência do mesmo indica pertencer ao grupo A ou B1. Da mesma forma, o gene *yjaA* permite a discriminação entre o grupo B2 e grupo D (Figura 4). Já o gene

TSPE4.C2 quando presente indica que são cepas do grupo B1 e se ausente são do grupo A (Clermont, Bonacorsi et al. 2000).

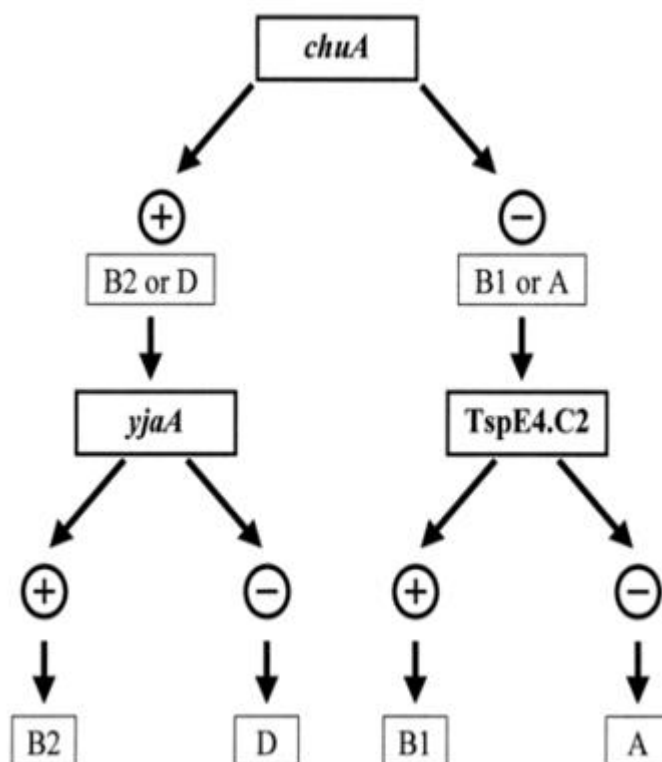


Figura 4. Esquema utilizado para a determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli* baseado na amplificação dos genes *chuA*, *yjaA* e *TspE4.C2*. Fonte: Adaptado, (Clermont, Bonacorsi et al. 2000).

As cepas virulentas geralmente classificam-se no grupo B2, porém algumas podem ser classificadas no grupo D. Por outro lado, os isolados considerados comensais pertencem aos grupos A e B1 (Clermont, Bonacorsi et al. 2000).

1.7. Tipagem molecular por *MLST*

Atualmente, um dos métodos de tipagem molecular que utiliza sequenciamento e que vem sendo empregado por diversos pesquisadores para diferentes micro-organismos é a *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Maiden *et al*, propuseram essa técnica e, a partir de então, tem-se apresentado como uma importante e eficaz ferramenta na caracterização molecular e investigação epidemiológica de patógenos bacterianos (Maiden, Bygraves et al. 1998). Esta técnica surgiu a partir de uma variação do *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) (Selander, Caugant et al. 1986), baseada no estudo de diferentes alelos de genes essenciais ou de manutenção, também conhecido como *housekeeping*, que são genes conservados e transcritos em todos os tipos de células, sendo possível distinguir a

variabilidade entre bactérias relacionadas em subespécies ou cepas (Ndoye, Lessard et al. 2011).

Para cada gene de manutenção, as diferentes sequências presentes dentro de uma espécie bacteriana são atribuídas como alelos distintos e, para cada isolado, o conjunto de alelos dá origem ao *sequence type* (ST), que são armazenados no banco de dados após a verificação e ao final, são feitas análises filogenéticas comparando STs de diferentes complexos clonais, análises populacionais e evolucionárias de patógenos bacterianos (Urwin and Maiden, 2003).

Para encontrar o equilíbrio entre uma identificação aceitável, tempo e custo para a tipagem, cerca de sete a oito genes de manutenção são utilizados e cada fragmento interno tem aproximadamente 450-500 pares de bases. Tanto o número e o tipo de genes *housekeeping* variam de espécie para espécie. No caso *E. coli* são baseados na sequência de nucleotídeos de sete genes *housekeeping*: *adk* (adenilato quinase); *fumC* (fumarato hidratase); *gyrB* (DNA girase); *icd* (isocitrato/isopropilmalato desidrogenase); *mdh* (malato desidrogenase); *purA* (adenilosuccinatodesidrogenase) e *recA* (proteína de ligação do DNA) (Wirth, T. et al., 2006).

MLST apresenta diversas vantagens em comparação com outras técnicas, uma delas é que os dados de sequência são portáteis, podendo aplicar um grande número de isolados por um baixo custo, transformando tal técnica em altamente reprodutiva e os perfis de isolados alélicos podem ser facilmente comparados e depositados em uma base de dados online através da Internet, possibilitando análise comparativa da diversidade genética das bactérias em diferentes partes do mundo (Urwin and Maiden 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a diversidade bacteriana em culturas de caldo MacConkey de materiais clínicos de portadores de DC por técnicas de genética molecular e correlacionar às propriedades dos isolados de *E. coli* com possíveis diferenças com os pacientes controles.

2.2. Objetivos Específicos:

- Verificar a diversidade da microbiota intestinal a partir da TGGE;
- Classificar em filogrupos da coleção de referência de *E. coli*;
- Investigar as presenças de genes *wzx* e *wzy* para os sorogrupos O25 e O83;
- Examinar a capacidade de formação de biofilmes das cepas de *E. coli* e classificar os tipos de aderência celular;
- Realizar a tipagem molecular dos isolados de *E. coli* por meio do MLST.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Culturas bacterianas

Neste trabalho, foram estudadas culturas de mistura de micro-organismos (pools) pela semeadura direta e crescimento em caldo MacConkey, de fezes e/ou biópsias intestinais de portadores de DC e de indivíduos controles atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP). Todos os procedimentos conduzidos relativos aos pacientes foram aprovados pela comissão de ética local em Pesquisa. O cultivo bacteriano foi realizado entre 2011 e 2012, e fez parte do estudo de quantificação bacteriana da microbiota de portadores de DC (de Souza, de Carvalho et al. 2012). As culturas foram mantidas em caldo BHI acrescido de 15% de glicerol a -80°C.

Uma parte do estudo consistiu em verificar a diversidade de bactérias gram-negativas presentes nas culturas, visando comparar a microbiota gram-negativa cultivável de portadores de DC e de pacientes controles. Para isto, foram utilizados 56 pools, sendo 32 pools de 9 pacientes com DC e 24 pools obtidos de 8 indivíduos controles, cujas informações são apresentadas na tabela 1 e na referência (de Souza, de Carvalho et al. 2012). Em um segundo momento ou em paralelo, colônias de *E. coli* foram identificadas e isoladas destes pools e estocadas, para serem submetidas à tipagem molecular e pesquisa de algumas propriedades de virulência.

Tabela 1. Informações sobre o número e origem das culturas utilizadas neste estudo.

Paciente*	Sexo**	Nº culturas	
		por paciente	Origem culturas*
DC1	M	3	Cólon ascendente, descende e sigmóide
DC2	M	4	Cólon descendente, íleo, reto e fezes
DC3	M	4	Cólon transverso e sigmóide, íleo e fezes
DC4	M	4	Cólon ascendente e sigmóide, íleo e fezes
DC5	M	4	Cólon sigmóide, ceco, íleo e fezes
DC6	F	2	Ceco e reto
DC7	F	4	Cólon ascendente, sigmóide e transverso e fezes
DC8	F	3	Cólon sigmóide, ceco e íleo
DC9	F	4	Cólon ascendente e sigmóide, íleo e fezes
Co1	M	1	Fezes
Co2	M	4	Cólon ascendente e descendente, íleo e fezes
Co3	M	4	Cólon ascendente e descendente, íleo e fezes
Co4	M	3	Cólon ascendente e descendente e fezes
Co5	F	4	Cólon ascendente, reto, íleo e fezes
Co6	F	1	Fezes
Co7	F	4	Cólon ascendente e descendente, reto e fezes
Co8	F	3	Cólon ascendente, descende e sigmóide

*Paciente: DC, portador de doença de Crohn; Co, pertencente ao grupo controle.

**Sexo: M, masculino; F, feminino.

3.2. Determinação da diversidade bacteriana

Foi realizada por TGGE de amplicons dos domínios V6-V8 da região 16Sr DNA das culturas brutas (pools) e feito uma comparação do perfil de bandas de diferentes culturas previamente conhecidas. Considerando que vários trabalhos sugerem que há um aumento na população de *E. coli* no intestino de portadores de DC, e a fim de identificar a presença desta bactéria nos pools estudados, foi incluída em cada gel, uma amostra correspondente ao amplicon 16Sr DNA-V6-V8 de *E. coli*, previamente identificado, como controle positivo.

3.2.1. Extração do DNA e PCR

Inicialmente, as culturas foram submetidas à extração e purificação de DNA, utilizando-se o *Stool DNA Isolation Kit* (Norgen Biotek Corporation, Ontario, Canadá), de

acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, utilizando-se o DNA das culturas como moldes, foram feitas PCR com os primers U968 e L1401 que permitem a amplificação dos domínios V6 a V8 da região 16S rDNA. As sequências dos primers e outras informações sobre as PCR realizadas durante este trabalho estão apresentadas na tabela 2. Além da sequência mostrada nesta tabela, o primer U968 apresentou um “grampo de GC” formado por nucleotídeos das bases guanina e citosina alternada. O acréscimo deste grampo teve por objetivo de evitar a separação das fitas do DNA durante a TGGE.

Os componentes da PCR compreenderam mistura master obtida como fórmula pronta, 0,1µM dos primers e 10% do DNA preparados num volume total de 50µL por amostra, em tubos de 0,2 ml. A reação ocorreu no termociclador *Master Cycler Pro S Thermocycler* (Eppendorf, Hamburg, Germany) nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por 1'; 30 ciclos de 94°C por 30'' (desnaturação), 56°C por 30'' (anelamento), e 68°C por 1' (extensão), seguidos de uma extensão final de 68°C por 7'.

Após a PCR, os amplicons foram visualizados em gel de agarose de onde foram purificados, utilizando-se o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as recomendações do fabricante.

Tabela 2. Primers e outras informações relativas às PCRs realizadas neste trabalho.

Finalidade	Gene	Primers (5'-3')	Anelamento (T°C)	Amplicon (pb)
Det. divers. Bacteriana	16SV6-V8	(F) GAACGCGAAGAACCTTAC (R) GCGTGTGTACAAGACCC	56	433
Grupos Filogenéticos	<i>gadA</i>	(F) GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG (R) GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC	65	373
	<i>chuA</i>	(F) ATGATCATCGCGGCGTGCTG (R) AAACGCGCTCGCGCCTAAT	65	281
	<i>yjaA</i>	(F) TGTTCGCGATCTTGAAAGCAAACGT (R) ACCTGTGACAAACCGCCCTCA	65	216
	TSPE4.C2	(F) GCGGGTGAGACAGAAACGCG (R) TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG	65	152
Detecção O25	<i>wzy</i>	(F) AGAGATCCGTCTTTTATTTGTTTCGC (R) GTTCTGGATACCTAACGCAATACCC	55	230
Detecção O83	<i>wzx</i>	(F) GTACACCAGGCAAACCTCGAAAG (R) TTCTGTAAGCTAATGAATAGGCACC	55	362
MLST	<i>adk</i>	(F) ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG (R) CCGTCAACTTTCGCGTATTT	54	583
	<i>fumC</i>	(F) TCACAGGTCGCCAGCGCTTC (R) TCCCGGCAGATAAGCTGTGG	54	806
	<i>gyrB</i>	(F) TCGGCGACACGGATGACGGC (R) GTCCATGTAGGCGTTCAGGG	60	911
	<i>icd</i>	(F) ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCA CA (R) GGACGCAGCAGGATCTGT	54	878
	<i>mdh</i>	(F) ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCT GGCGG (R) TTAACGAACCTCCTGCCCCAGAGCGATA TCTTTCTT	60	932
	<i>purA</i>	(F) CGCGCTGATGAAAGAGATGA (R) CATACGGTAAGCCACGCAGA	54	816
	<i>recA</i>	(F) CGCATTCGCTTTACCCTGACC (R) TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	58	780

3.2.2. Preparo do gel e definição do gradiente de temperatura da TGGE

3.2.2.1. Preparo do gel

A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida contendo 6% de acrilamida/bisacrilamida, uréia 8M, 20% de formamida, 2% de glicerol, 40 mM de TAE, pH 8,0, 900 ppm de TEMED e 0,04% de persulfato de amônio (PSA). Inicialmente, foram misturados, à quente, todos os reagentes, exceto o TEMED e o PSA e, em seguida, estes foram acrescentados visando a polimerização do gel. Imediatamente após a adição do TEMED e PSA, a mistura foi vertida nas placas de vidro molde, onde, após 1 hora, se deu a polimerização da poliacrilamida. Os moldes foram então retirados, sendo o gel colocado no sistema TGGE mini (024-000, Biometra), após a aplicação de triton a 0,1% sobre o termo bloco. Sobre o gel, foi colocado um microfilme de polibond e, nas extremidades, cortes de papel de filtro “Whatman”, destinados a permitir a passagem do tampão de corrida, das cubas para o gel.

3.2.2.2. Definição do gradiente de temperatura usado na TGGE

Além dos pools das culturas das amostras dos pacientes e dos controles positivos de *E. coli*, foram incluídas algumas culturas de bactérias gram-negativas previamente conhecidas, majoritariamente enterobactérias (*Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Hafnia*, *Providencia*, *Morganella*, *Citrobacter* e *Campylobacter*) que tiveram o seu 16SV-V8r DNA amplificado, conforme descrito acima. Os amplicons destas culturas foram empregados para se definir o gradiente de temperatura ideal para a separação das bandas e formação do perfil representativo da diversidade bacteriana encontrada nas culturas dos pools. Para isto, 5 ul de amplicons purificados do DNA de cada uma destas culturas foram misturados e de *E. coli*, o volume total resultante acrescentado a um gel apresentando canaleta única. Foi então aplicada uma eletroforese perpendicular, ou seja, na qual o sentido da diferença de potencial é perpendicular ao sentido de variação de temperatura no termo bloco, para a definição do gradiente de temperatura que melhor separasse as diferentes sequências dos amplicons de cada cultura, para isso, foram adotadas arbitrariamente as temperaturas de 30 e 50°C.

A visualização das bandas foi realizada no capturador de imagens *Gel doc EZ Imager* (Biorad, Hercules, USA), após a fixação do gel seguido de coloração por nitrato de prata, conforme recomendação do manual do sistema (Biometra, 2002). O intervalo de temperatura onde ocorreu a separação de bandas situou-se entre 40 e 44°C (Figura 5). Deste modo, este

gradiente foi empregado para a determinação da diversidade bacteriana das culturas em pools, em TGGE paralela.

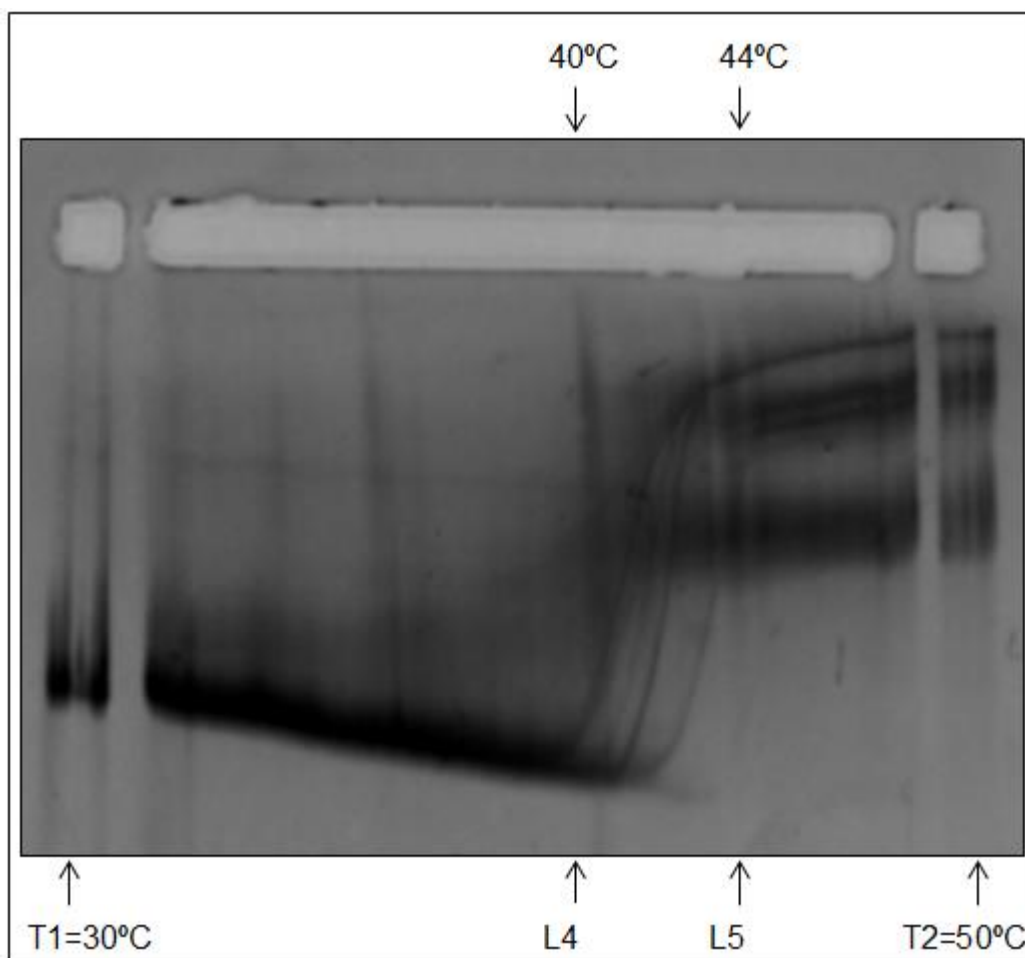


Figura 5. Eletroforese perpendicular de mistura de amplicons de enterobactérias, em gradiente de temperatura de 30 a 50°C mostrando a faixa de separação das bandas (entre 40 e 44°C).

3.3. Isolamento e identificação de *E. coli*

O isolamento de *E. coli* foi feito pela semeadura por esgotamento em meio seletivo, ágar MacConkey, de alíquotas dos pools e cultivo por uma noite a 37°C. A partir do crescimento nestas condições, de 2 a 10 colônias bacterianas foram transferidas para os meios de EPM, Mili e Citrato de Simmons e submetidas às provas de identificação por procedimentos bacteriológicos convencionais e foram consideradas como *E. coli* as colônias que apresentaram resultados correspondentes ao perfil de provas (Tabela 3). Estes isolados de *E. coli* foram então cultivados, por uma noite, em tubos de ágar nutriente inclinado, nos quais as bactérias foram estocadas em temperatura ambiente.

Tabela 3. Perfil bioquímico de *E. coli*.

Provas	Resultado
Produção de Gás de glicose	+ ou -
Fermentação de lactose	+
Fermentação da glicose	+
Produção de H ₂ S	-
L-Triptofano desaminase	-
Urease	-
Motilidade	+ ou -
Indol	+
Lisina Descarboxilase	+ ou -
Citrato de sódio	-

3.4. Tipagem molecular dos isolados de *E. coli*

A tipagem molecular compreendeu: a) classificação bacteriana em um dos grupos filogenéticos da EcoR, b) detecção dos genes *wzy* e *wzx* que identificam os sorogrupos O25 e O83 e c) MLST.

Todas estas técnicas de tipagem envolveram ou foram baseadas em PCR, sendo que o DNA utilizado na reação foi obtido na forma de lisados bacterianos brutos ou extraído e purificado pelo *Stool DNA Isolation Kit* (Norgen Biotek Corporation, Ontario, Canadá), de acordo com as recomendações do fabricante. Em todas estas PCRs foram utilizadas misturas mix (master mix) cinco vezes concentradas e obtidas como fórmulas prontas, contendo Taq DNA polimerase, cloreto de magnésio e tampão (New England Biolabs), empregados conforme as orientações do fabricante. A análise dos produtos de PCR foi realizada em gel de agarose a 2% tratado com intercalante de DNA gel red, na proporção de 10⁻⁴ em relação ao gel, por meio do capturador de imagens *Gel doc EZ Imager* (Biorad, Hercules, USA). As PCRs foram realizadas no termociclador *Master Cycler Pro S Thermocycler* (Eppendorf, Hamburg, Germany).

3.4.1. Determinação de grupos Filogenéticos de *E. coli*

A determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli* foi baseada na detecção dos genes *gadA*, *chua*, *yjaA* e *TspE4.C2* e suas combinações que definem os grupos A, B1, B2 e D, conforme discutido no item 1.6 (Introdução). Para isto, foi adotado o protocolo de Clermont e colaboradores, com modificações introduzidas por Doumith (Doumith, Day et al. 2012), em

multiplex PCR, utilizando-se os primers apresentados na tabela 2. A reação de multiplex PCR foi feita num volume de 25 µl em tubos de polipropileno de 0,2 ml contendo master mix diluída 5x e os 8 primers em concentração final de 1µM. O ajuste na concentração dos componentes da reação foi feito com água livre de nuclease.

Uma vez preparada mistura dos reagentes, foi acrescentado 10% de DNA, e os tubos colocados no termociclador, onde ocorreu a reação nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por 1'; 30 ciclos a 94°C por 4' (desnaturação), 65°C por 30'' (anelamento) e 72°C por 30'' (extensão), seguidos de uma extensão final realizada a 72°C durante 5'.

3.4.2. Detecção dos genes *wzy* e *wzx* que identificam os sorogrupos O25 e O83

A detecção dos genes *wzy* e *wzx* de O25 e O83, respectivamente, foi feita conforme recomendação de Li e colaboradores (Li, Liu et al. 2010). Os componentes da reação foram preparados em volumes de 50 µl (em tubos de 0,2 ml), consistindo em master mix diluída 5x, 0,4µM de primers apresentados na tabela 2 e 10% de DNA, sendo o volume ajustado com água livre de nuclease. As seguintes condições foram empregadas: desnaturação a 95°C durante 5', 30 ciclos de 95°C por 30' (desnaturação), 55°C por 1' (anelamento), e 72°C por 1' (extensão), seguidos de uma extensão final a 72°C por 5''

3.4.3. MLST

A tipagem por *MLST* compreende ao sequenciamento e análise das sequências de genes envolvidos em *housekeeping*. A comparação destas sequências de diferentes bactérias permite o agrupamento de isolados distintos de ST, conforme apresentem semelhanças nas sequências dos genes. No caso de *E. coli*, se baseia na análise de sete genes essenciais: *adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA*, os quais são amplificados por PCR e são analisadas por comparação com o banco de dados da Universidade de Michigan (Achtman, Hale et al. 2013). No projeto deste Mestrado, previa-se que o sequenciamento seria feito pela tecnologia Ion Torrent, de última geração, supostamente mais barata quando há um grande número de amostras bacterianas a serem tipadas. Todavia, não foi possível ajustar alguns parâmetros dos testes pilotos, de modo que não tivemos sucesso em realizar o *MLST* das amostras por Ion Torrent. Entretanto, amostras de *E. coli* de um dos pacientes deste estudo tiveram seu genoma parcialmente sequenciado e as informações obtidas permitiram a identificação de seu ST.

3.5. Avaliação da capacidade de aderência dos isolados de *E. coli*

3.5.1. Produção de biofilme

O teste para avaliar a capacidade de produção de biofilme seguiu o protocolo de Martinez-Medina et al (Martinez-Medina, Naves et al. 2009). Volumes de 130µl de culturas *over night* a 37°C em caldo de Luria-Bertani (LB) acrescido de 5% de glicose e diluído 100 vezes em MEME/SFB/G (meio de Eagle + 10% de soro fetal bovino + 8% de glicose) foram dispensados nos poços de microplacas de poliestireno. As placas foram incubadas a 30°C por uma noite e a densidade óptica (DO) das culturas medida a 620nm. As culturas foram removidas dos poços, que em seguida, foram lavados com salina tamponada com fosfatos (PBS), secos e corados com solução de cristal violeta a 1% em etanol por 20 minutos para solubilização das bactérias aderentes. A DO da suspensão resultante foi então lida a 540nm. Como controle positivo do teste, foi empregado a cepa de referência *E. coli* O42 e como controle negativo foi utilizado MEME/SFB/G. Os resultados foram expressos em termos de formação específica de biofilme (FEB), com base na fórmula: $FEB = (A - B) / C$, onde $A = DO_{540}$ das suspensões de corante dos poços com culturas, $B = DO_{540}$ das suspensões de corante dos poços com MEME/SFB/G e $C = DO_{620}$ das culturas. A determinação da capacidade de formação de biofilme foi feita em 8 replicatas, sendo o resultado expresso como média dos dados de cada um dos 8 poços.

3.5.2. Teste de Adesão em células Hep-2

3.5.2.1. Manutenção e preparo das monocamadas de células

Para obtenção da monocamada celular, as células Hep-2 foram cultivadas em garrafas de poliestireno com área de 75cm², contendo 25 ml de MEM + 10% de soro fetal bovino (MEM/SFB) e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ através de repiques sucessivos, realizados periodicamente. Aproximadamente 10⁵ células suspensas em MEM/SFB foram transferidas para poços com diâmetro de 12 mm de microplacas de poliestireno, contendo lamínulas de vidro, nos quais foram feitos os testes.

3.5.2.2. Teste de adesão

Inicialmente, o meio de cultura foi desprezado das placas e a monocamada de células foi lavada, de 3 a 4 vezes, com PBS. O volume original (0,7-1,0 ml) de poço foi repostado com MEM/SFB com 1% de D-manose. Em seguida, 20 µl de culturas bacterianas de uma noite a 37°C foram inoculadas em cada poço e as placas incubadas 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. O resultado individual foi baseado na análise de 200 células epiteliais da monocamada. Foi considerada aderente a amostra de *E. coli* que apresentou, na área observada, um número médio de bactérias/célula superior a 1. As amostras aderentes foram classificadas quanto ao fenótipo expresso (agregativo, localizado e difuso).

3.6. Análises estatísticas

Neste trabalho foram realizadas as análises estatísticas através do teste T (*Student*) quando tem como base para o cálculo os valores da média, do desvio-padrão e da variância da população e aplicado teste do χ^2 . Valores de P inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Diversidade bacteriana

4.1.1. Perfil de TGGE de amplicons 16S V6-V8 rDNA de bactérias conhecidas

A figura 6 representa a mobilidade feita por TGGE de amplicons 16S V6-V8 rDNA de 9 culturas de enterobactérias (*E. coli*, *Shigella*, *Hafnia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, respectivamente), em um gradiente de temperatura de 40-44°C, verificado a separação das bandas ideal. Na figura é possível notar que, em relação cada gênero bacteriano há uma mobilidade distinta e característica, com exceção das semelhanças entre *Providencia*, *Morganella* e *Proteus* e *E. coli* e *Shigella*. Vale ressaltar que estes gêneros bacterianos cujas mobilidades de amplicons não foram distinguidas com clareza, são taxonomicamente muito relacionados, e isso explica a semelhança na posição das bandas.

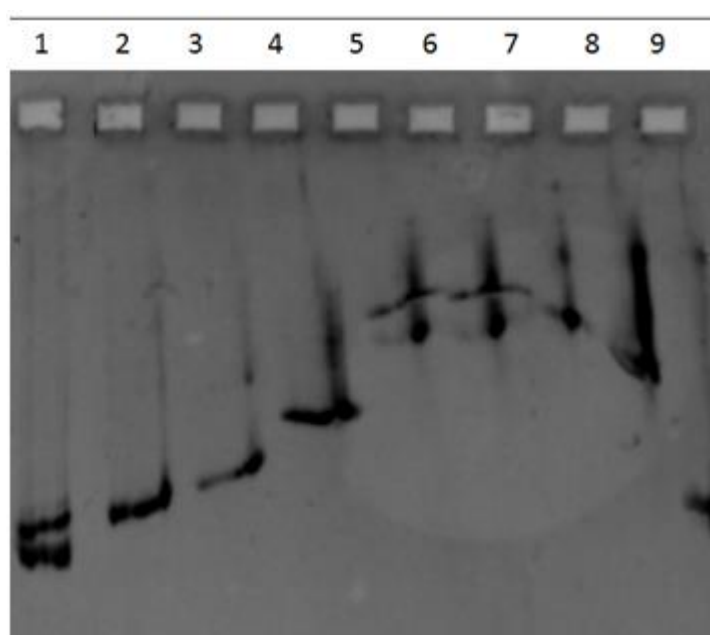


Figura 6. TGGE de amplicons de 16S V6-V8 rDNA de algumas Enterobactérias: 1-*E. coli*, 2-*Shigella*, 3-*Hafnia*, 4-*Pseudomonas*, 5-*Proteus*, 6-*Providencia*, 7- *Morganella* 8-*Klebsiella*, 9- *Enterobacter*.

4.1.2. Disbiose em bactérias gram-negativas na doença de Crohn

Comparando-se o perfil de bandas de TGGE de culturas de bactérias gram-negativas de diferentes materiais clínicos de portadores de DC com culturas equivalentes de indivíduos controle, foi notado um menor número de bandas entre os pacientes de DC na maioria dos casos analisados. Entre culturas dos nove portadores de DC analisadas, em apenas um caso o perfil de bandas de TGGE foi semelhante ao dos indivíduos sem a doença. A figura 7 mostra

o TGGE de amplicons 16SV6-V8 rDNA de culturas de 4 materiais clínicos diferentes de portadores de DC e um número equivalente de controles. Conforme pode ser visto na figura, além da diversidade bacteriana ser menor em pacientes com DC, culturas destes pacientes, em geral apresentava apenas a banda correspondente à *E. coli*. Estes resultados sugerem uma evidente disbiose na população de bactérias gram-negativas, com favorecimento de *E. coli*, em portadores de DC.

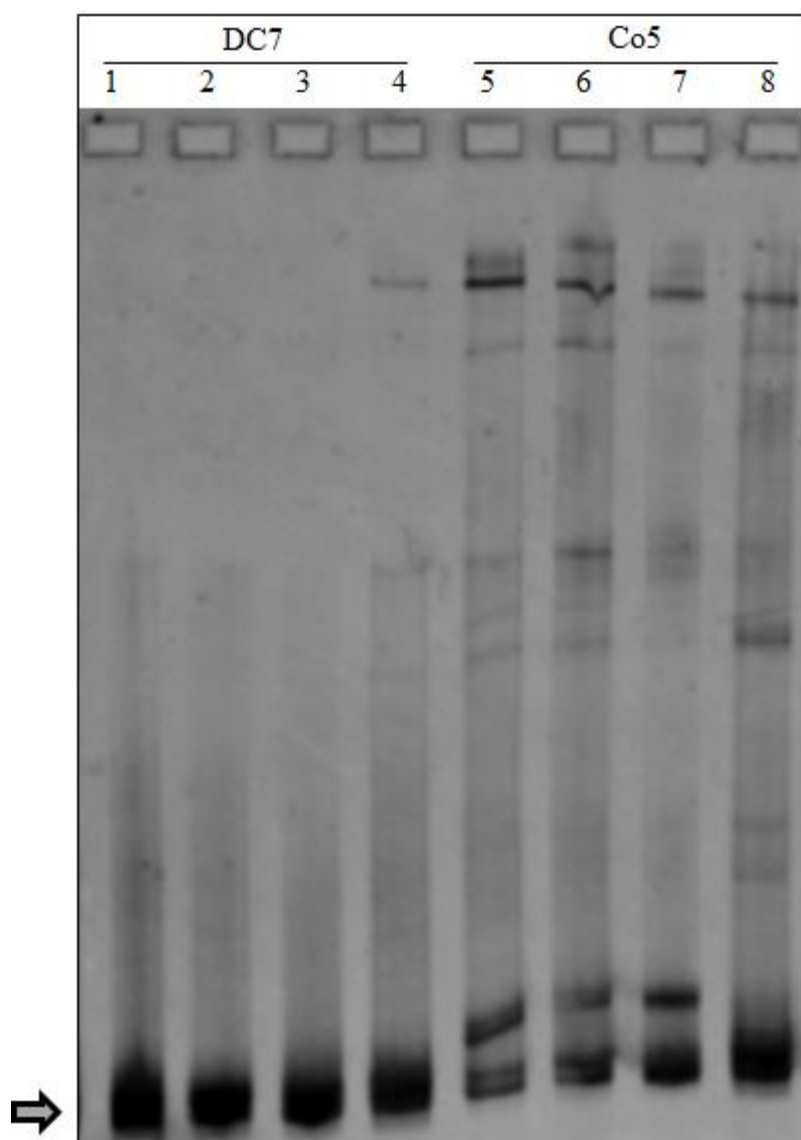


Figura 7. TGGE de amplicons de 16S V6-V8 rDNA de culturas de diferentes materiais clínicos de um paciente com DC (DC7) e um indivíduo controle (Co5): 1- biópsia de cólon ascendente; 2- biópsia de cólon transversal; 3- biópsia de cólon sigmóide; 4- fezes; 5- fezes; 6- biópsia de cólon ascendente; 7- biópsia de reto; 8- biópsia de íleo. A sete indica a banda correspondente a *E. coli*.

A fim de obter evidências adicionais sobre um maior predomínio de *E. coli* nas culturas de portadores de DC, 2 culturas de material clínico (biópsias do reto e íleo) de um

paciente controle (do paciente Co5, utilizadas no experimento acima) e 6 culturas de 3 portadores de DC foram submetidas ao sequenciamento de amplicons da região V6, através da técnica Ion torrent. Conforme pode ser observado na figura 8, a proporção de sequências *E. coli* em portadores de DC foi bem superior à observada em controles. Nas culturas do paciente DC8, por exemplo, mais de 80% das sequências corresponderam a *E. coli*. Vale ressaltar que as bandas observadas na figura 7 das culturas do paciente Co5 não foram definidas pelo sequenciamento, embora tenham sido detectas pela TGGE. Estas bandas provavelmente correspondem às sequências identificadas como enterobactérias não classificadas e que foram mais abundantes nas culturas deste paciente do que nas culturas dos portadores de DC (Figura 8).

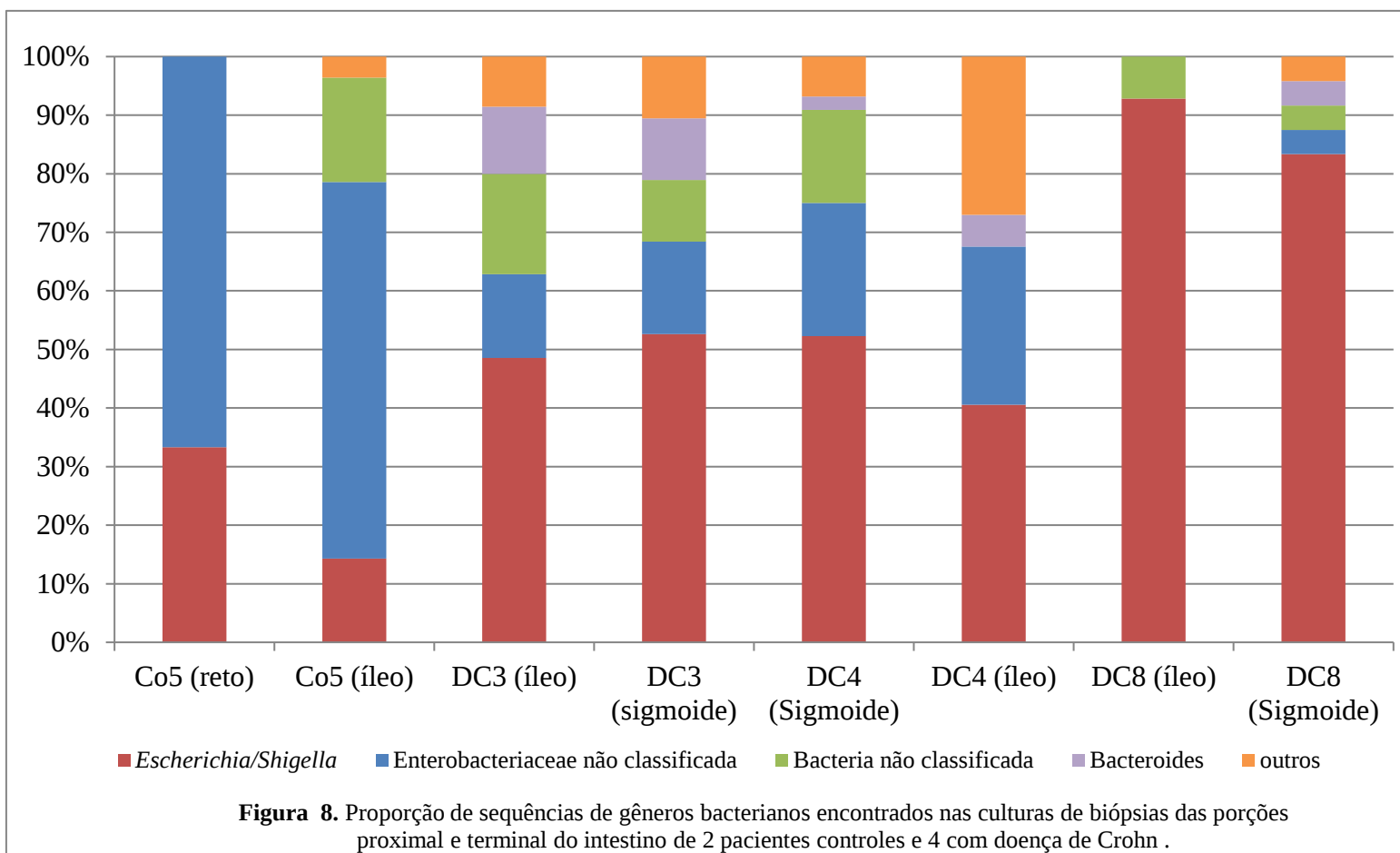
4.2. Sorogrupos O25 e O83, filogrupos EcoR e ST

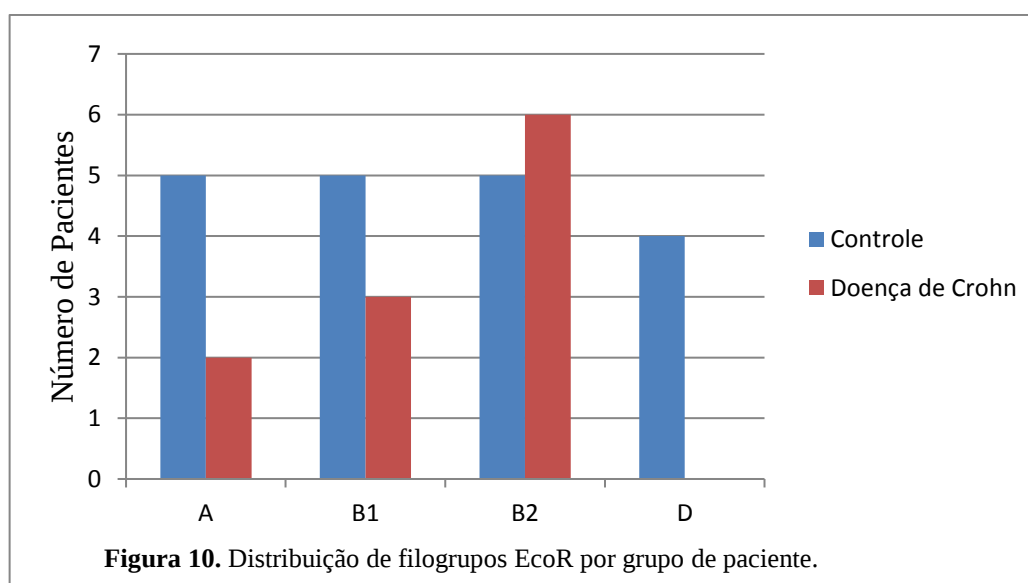
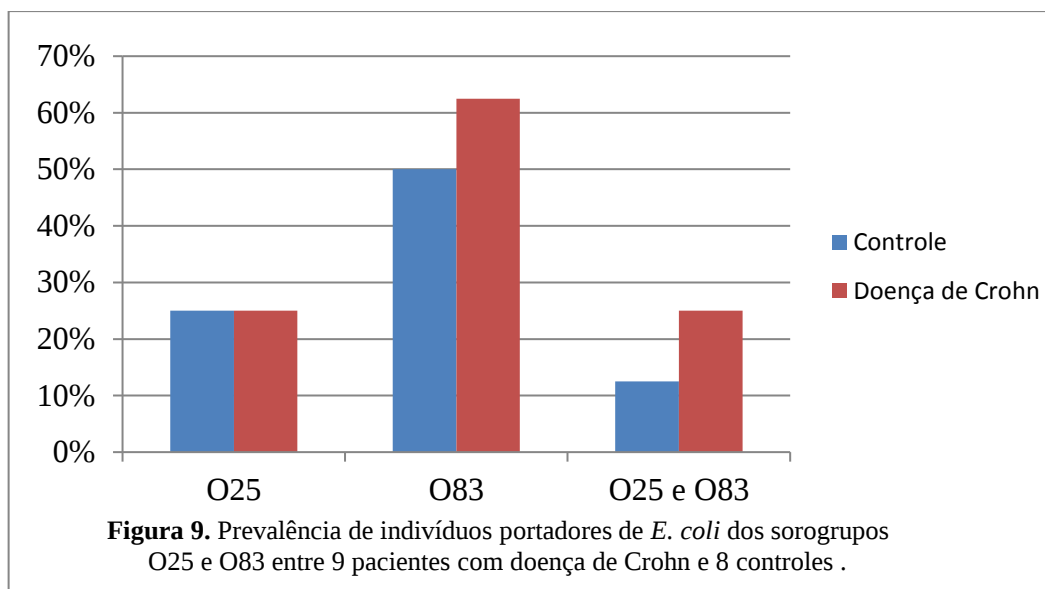
Dentre os 17 pacientes deste estudo, apenas 1 não apresentou *E. coli* positiva para os genes que detectam os sorogrupos O25 e O83 (*wzy* e *wzx*, respectivamente). Os demais apresentaram culturas contendo pelo menos 1 destes sorogrupos. Não houve, porém, diferença na prevalência destes sorogrupos em quaisquer dos grupos de estudo. O sorogrupo predominante em ambos os grupos de estudos foi O83 (Figura 9).

A figura 10 apresenta a distribuição de filogrupos EcoR por grupo de paciente. Houve uma maior prevalência de indivíduos apresentando *E. coli* dos filogrupos A e B1 entre os controles e uma menor prevalência de B2 em relação aos portadores de DC. Todavia, estas diferenças não foram significativas estatisticamente. Por outro lado, *E. coli* do filogrupo D só foram encontradas entre indivíduos do grupo controle, diferença esta, estatisticamente significativa.

Conforme mencionado no item 3.4.3 (Material e Métodos) foi identificado o ST de duas amostras de *E. coli* de um mesmo paciente com DC (paciente DC7), com base em informações de sequenciamento parcial do genoma. Estas amostras foram obtidas em momentos diferentes. Uma delas foi coletada em abril de 2011, como cultura em pool e faz parte da coleção aqui estudada. A outra amostra, isolada em dezembro de 2009, foi identificada como sendo do sorotipo O25:H4 e ST 131 (da Silva Santos, Gomes Romeiro et al. 2015). A amostra de 2011 é do sorogrupo O83 e ST 479. Esta amostra foi identificada praticamente como cultura pura nos 4 pools de diferentes materiais clínicos do paciente DC7, sendo que a tipagem de um dos ST de um dos pools foi feita através dos experimentos pilotos de padronização de *MLST* por sequenciamento de última geração. ST 479 é relativamente incomum, porém, ST-131 corresponde a um clone virulento de *E. coli* de distribuição

universal, marcado pela capacidade de produção de beta lactamases de espectro estendido, que é o mecanismo de resistência mais importante das enterobactérias.





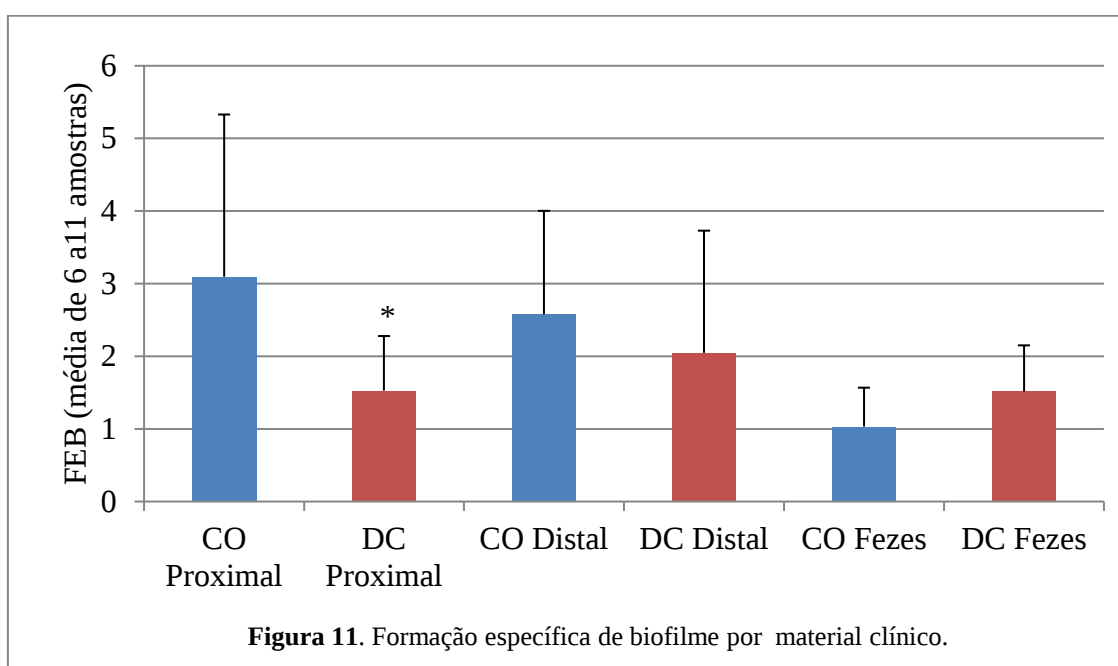
4.3. Adesão do isolados de *E. coli*

4.3.1. Adesão e padrões de adesão em células Hep-2

Os resultados do teste de adesão a células Hep-2 são disponíveis dados de 5 controles e 6 pacientes com DC. Os seguintes fenótipos de adesão agregativa, difusa e localizada foram observados na população de *E. coli* testada. Além disto, foram detectadas amostras capazes de induzir efeito citotóxico (manifesto pelo descolamento celular) combinado ou não com a expressão dos padrões acima. Dentre estes padrões AA, AD e AL, o dominante foi AA, encontrado em *E. coli* de todos os pacientes, controles ou com DC, portanto não houve variação caso-controle, em relação aos fenótipos de interação celular.

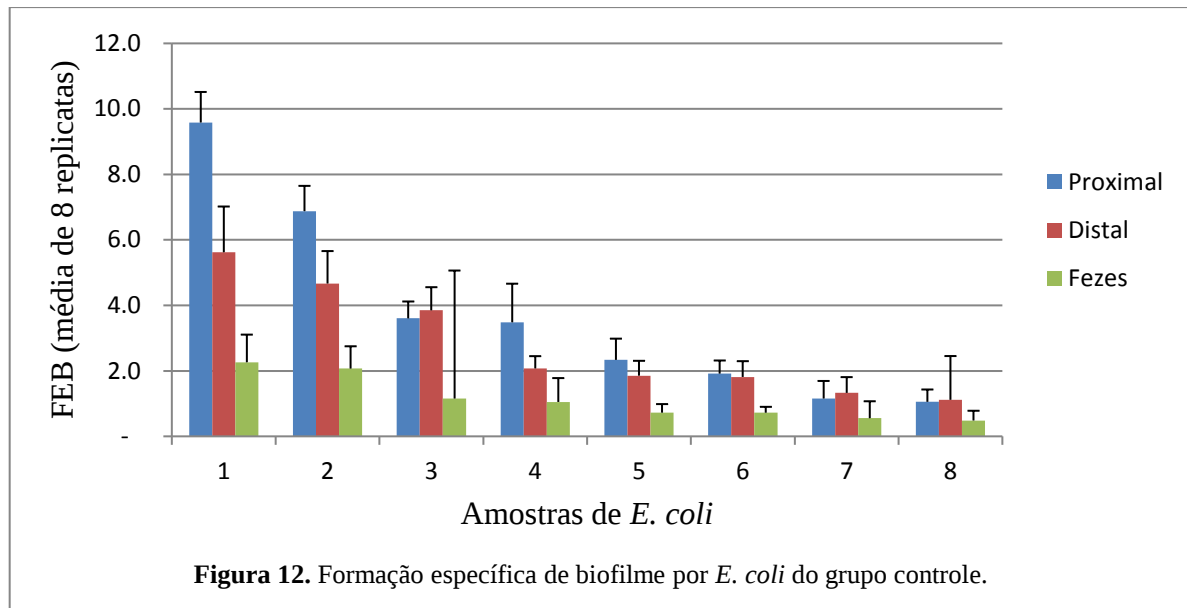
4.3.2. Produção de biofilme

O teste de produção de biofilme foi feito em 8 replicatas por amostra de *E. coli* e o resultado expresso em termos de FEB, que leva em consideração variações na velocidade de crescimento de uma amostra bacteriana para outra. A FEB foi calculada como média dos resultados das 8 replicatas. Sem considerar o material clínico da cultura, não se observou diferença significativa na comparação dos resultados de casos com controles. Entretanto, quando este fator, relacionado ao local de isolamento bacteriano no intestino, nota-se que na região proximal (íleo e cólon ascendente), as amostras de *E. coli* de controles são capazes de formar biofilme de forma mais intensa do que as amostras de portadores de DC desta mesma região (Figura 11). Nas outras regiões do intestino, não se observou diferença entre casos e controles.



* Variação estatisticamente significativa

Outro dado curioso, em relação à formação de biofilme e observado entre as amostras bacterianas de indivíduos controles, mas não de casos, diz respeito à menor capacidade de formação de biofilme das amostras de origem fecal, em comparação com amostras de biópsias. Enquanto que os valores médios de FEB apresentados por *E. coli* de biópsias das regiões proximal e distal do intestino foram respectivamente de $3,1 \pm 2,2$ e $2,6 \pm 1,4$, o valor para amostras de origem fecal foi de $1,03 \pm 0,5$ ($p=0,01$). A figura 12 mostra resultados individuais de FEB de oito amostras de *E. coli* de cada uma destas regiões.



5. DISCUSSÃO

O intestino humano é colonizado por uma microbiota complexa e diversificada. As bactérias no trato gastrointestinal desempenham múltiplos papéis na saúde humana, como reações metabólicas ausentes em humanos (Bäckhed et al., 2005), modulação da morfologia e fisiologia intestinais (Chowdhury et al., 2007) e desenvolvimento do sistema imune (Kelly et al., 2007). Parece ser consenso entre os especialistas que a microbiota de portadores de DC apresenta um desequilíbrio na composição de espécies bacterianas, com a redução de membros de certos filos como os Firmicutes e aumento de Proteobactérias (Mukhopadhyaya, H et al. 2012). O principal representante deste último grupo é a *E. coli*, cujo envolvimento com a RCU e DC tem sido extensivamente estudado. Resultados desses estudos têm levado à descrição das *adherent and invasive E. coli* (AIEC), patótipo sobre o qual várias evidências se acumularam nos últimos anos, no sentido estabelecer sua participação na etiologia da DC (Agus, Massier et al. 2014).

Este trabalho teve como objetivo primário identificar variação na microbiota de bactérias gram-negativas em portadores com DC. Em sua maioria, estas bactérias fazem parte do filo Proteobacteria, tendo entre seus principais representantes as Enterobactérias. A abordagem empregada para a análise da diversidade bacteriana foi a amplificação de uma região variável (de V6 a V8) do gene que codifica a fração 16S do RNA ribossômico, utilizando-se primers específicos para os sítios do DNA que flanqueiam estas regiões e submissão dos amplicons a um gradiente de temperatura, visando o estabelecimento de um perfil de bandas, que refletem os grupos bacterianos presentes. O objeto da análise foram culturas de caldo MacConkey de diferentes materiais clínicos de portadores de DC e pacientes controles. Previamente à aplicação desta metodologia, houve a padronização da técnica, empregando culturas conhecidas, particularmente de Enterobactérias. O número de espécies empregadas para a definição do gradiente de temperatura foi pequeno, o que deve ter comprometido à detecção de alguns grupos nas culturas dos pools. Entretanto, a análise tal qual foi feita permitiu a detecção de disbiose nesta população bacteriana de portadores com DC. Em 8 dos 9 (89%) pacientes com DC foi possível culturas com um número pequeno (1-2) de bandas, ao passo que na maioria (7 de 8 pacientes) dos controles este número era de, no mínimo, 3 bandas (dados não mostrados). Empregando amplicons de *E. coli* como referência da corrida de TGGE, verificou-se que uma das duas bandas encontradas em culturas de pacientes com DC, correspondia à esta bactéria. Frequentemente, esta banda era mais intensa do que a de mobilidade correspondente nos géis de controle (Figura 7), sugerindo a existência

de um maior número de sequências desta bactéria nestes pacientes do que em controles. Embora feito com culturas de um único paciente, o resultado de sequenciamento da região V6 do 16Sr DNA correspondeu ao perfil de TGGE, aparentemente indicando um maior número de *E. coli* em portador de DC, do que em controles. A análise por TGGE apresentou algumas limitações, como por exemplo, a dificuldade de comparação de amostras distintas feitas em géis diferentes, em função da baixa reprodutibilidade.

As amostras de *E. coli* presentes nas culturas foram isoladas e submetidas à uma caracterização na pesquisa de sorogrupos O25 e O83, determinação dos filogrupos EcoR e análise das propriedades de aderência.

As escolhas dos sorogrupos O25 e O83 não foram ao acaso, visto que, frequentemente estes sorogrupos estão associados à infecções extra-intestinais, sendo encontrados no ambiente hospitalar comumente (Li, Liu et al. 2010) e também entre casos de DC (Martinez-Medina, Mora et al. 2009). No presente estudo, com exceção de um indivíduo controle, todos os demais apresentaram pelo menos um dos dois sorogrupos testados. Este resultado não é surpreendente, visto que os pacientes do estudo (casos ou controles) devem frequentar o ambiente hospitalar de modo rotineiro o que pode favorecer a aquisição destes tipos bacterianos. Neste sentido, foi interessante a detecção, em um dos pacientes com DC, do clone ST 131 capaz de expressar multi-resistência a drogas, e que foi detectado em várias regiões do mundo (Johnson, Urban et al. 2012).

Estudos realizados com a ECOR mostram que as cepas desta espécie se distribuem em quatro grupos filogenéticos principais denominados A, B1, B2 e D. Os grupos A e B1 são formados na maioria dos estudos por cepas pertencentes à microbiota intestinal ou causadoras de diarreia, enquanto as cepas com características extra-intestinais são pertencentes em maior frequência aos grupos B2 e em menor extensão ao grupo D (Clermont, et al 2000). Resultados obtidos foram semelhantes ao dos sorogrupos, ocorreu a detecção de amostras de *E. coli* do filogrupo B2 com prevalência parecida em casos e controles. Este dado contrasta com os de Kotlowski, os quais portadores de DII têm uma maior prevalência de B2 e D (Kotlowski, Bernstein et al. 2007), entretanto não existe um consenso de padrão em relação aos estudos dos filogrupos associados a doença, no trabalho de Girardeau et al, mostra cepas de *E. coli* distribuídas principalmente no grupo B1 e a menor quantidade no B2, sugerindo um padrão de virulência "atípica" (Girardeau, et al. 2005). Com base em diversos dados da literatura, é possível inferir que não existe um grupo exclusivamente patogênico, mas que os grupos apresentam combinações de isolados comensais e patogênicos.

No caso da interação celular, a capacidade de adesão a modelos celulares é uma característica compartilhada por linhagens patogênicas e comensais. Entretanto, elas podem ser distinguidas si pelo fenótipo de adesão que elas apresentam, foi o fato de os resultados do presente estudo (ausência de variação caso-controle), pois divergiram do trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo, no qual identificamos uma maior prevalência de amostras de *E. coli* capazes de expressar o padrão de adesão agregativo em células Hep-2 entre portadores de doença inflamatória intestinal (Thomazini, Samegima et al. 2011). O teste de adesão é sujeito a um número de variáveis, tais como o modo de interpretação da leitura das lâminas por diferentes observadores em diferentes leituras, tempo da cultura celular, tipo de célula utilizada. Além disso, é possível que diferenças no número analisado de amostras de *E. coli* por paciente e o número de pacientes estudado também possa contribuir para a divergência observada.

Sobre a capacidade de formação de biofilme, nós decidimos realizar ensaios para determiná-la e os dados do biofilme indicaram que parece haver variação no comportamento de diferentes populações bacterianas quanto à capacidade de aderir ao substrato. Estudos anteriores têm destacado aumento da produção de biofilmes em pacientes com DC com respeito a indivíduos controle (Swidsinski A, et al. 2002). De acordo com os resultados, foi observada variação caso-controle apenas na região proximal do intestino, local onde a maioria das lesões acontece em portadores de DC (Hendrickson, Gokhale et al. 2002). Além disso, foi possível observar também que as bactérias das fezes demonstram menor capacidade de formação de biofilme do que as associadas à mucosa, o que confirma os dados da literatura que diversos fatores influenciam na capacidade de produção de biofilme como natureza do material da superfície do substrato (Macedo, 2006), disponibilidade dos nutrientes, acúmulo de metabólitos tóxicos produzidos pelas espécies colonizadoras, pH e difusão de oxigênio (IST, 2008). As alterações na composição e a produção dos mesmos quando associados a mucosas têm sido correlacionados no aparecimento ou perpetuação da doença (Dicksved J, et al. 2008), entretanto, estudos mais concretos são necessários para verificar a relação dos biofilmes com a DC.

Em relação à caracterização dos isolados de *E. coli*, embora os dados apresentados sugerem as observações feitas acima, informações adicionais seriam necessárias, o que demandaria a ampliação dos experimentos e do número de amostras bacterianas testadas.

6. CONCLUSÕES

- Pacientes com DC apresentam disbiose evidente na população de bactérias gram-negativas, com favorecimento de *E. coli*, conforme notado pela TGGE;
- Ambos os sorogrupos O25 e O83 foram encontrados nas amostras dos pacientes, indicando que pode haver um favorecimento da aquisição desses tipos bacterianos no ambiente hospitalar que frequentam de modo rotineiro;
- Não há um consenso de padrão filogenético que esteja intimamente relacionado com DC;
- A produção de biofilme teve variação caso-controle na região proximal do intestino, local onde a maioria das lesões acontece em portadores de DC;
- Bactérias das fezes demonstraram menor capacidade de formação de biofilme do que as associadas à mucosa, sugerindo que o material da superfície de substrato pode influenciar na formação do biofilme.

Deve continuar a ser investigada a participação das bactérias *Escherichia coli* na patogênese e/ou manutenção das lesões da Doença Crohn.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTMAN, M., J. HALE, et al. "Population structures in the SARA and SARB reference collections of *Salmonella enterica* according to MLST, MLEE and microarray hybridization." *Infect Genet Evol*, 16: 314-325, 2013.

AGUS, A., S. MASSIER, et al. "Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies." *Biomed Res Int*, 2014: 567929, 2014.

ALVAREZ, A. L., F. O. ESPINAR, et al. "The application of microencapsulation techniques in the treatment of endodontic and periodontal diseases." *Pharmaceutics*, 3(3): 538-571, 2011.

ANDORRA, I., S. LANDI, et al. "Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques." *Food Microbiol*, 25(7): 849-856, 2008.

BÄCKHED F, LEY R; SONNENBURG JL, PETERSON DA, GORDON JI. "Host-bacterial mutualism in the human intestine." *Science*, 307(5717):1915-20, 2005.

BARCELOS, L. S., A. TALVANI, et al. "Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1." *J Leukoc Biol*, 78(2): 352-358, 2005.

BAUMGART, D. C. AND S. R. CARDING "Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology." *Lancet*, 369(9573): 1627-1640, 2007.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. "Doenças das aves". Campinas: FACTA, p.455-469, 2009.

BERGTHORSSON, U. AND H. OCHMAN. "Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*." *Mol Biol Evol* 15(1): 6-16, 1998.

BIOMETRA. *TGGE System Manual*. Germany. p. 51, 2002.

BRINGER, M. A., N. ROLHION, et al. "The oxidoreductase DsbA plays a key role in the ability of the Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 to resist macrophage killing." *J Bacteriol*, 189(13): 4860-4871, 2007.

CERI, H., M. E. OLSON, et al. "Needed, new paradigms in antibiotic development." *Expert Opin Pharmacother*, 11(8): 1233-1237, 2010.

CHO, J. H. "Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations." *World J Gastroenterol*, 14(3): 338-347, 2008.

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

CLERMONT, O., S. Bonacorsi, et al. "Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group." *Appl Environ Microbiol*, 66(10): 4555-4558, 2007.

COSNES, J., C. GOWER-ROUSSEAU, et al. "Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases." *Gastroenterology*, 140(6): 1785-1794, 2011.

COSTERTON, J. W., P. S. STEWART, et al. "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science* 284(5418): 1318-1322, 1999.

CROXEN, M. A. AND B. B. FINLAY. "Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity." *Nature*, 8(1): 26-38, 2010.

DA SILVA SANTOS, A. C., F. GOMES ROMEIRO, et al. "*Escherichia coli* from Crohn's disease patient displays virulence features of enteroinvasive (EIEC), enterohemorrhagic (EHEC), and enteroaggregative (EAEC) pathotypes." *Gut Pathog*, 7(1): 2, 2015.

DANESE, S., F. SCALDAFERRI, et al. "Platelets: new players in the mucosal scenario of inflammatory bowel disease." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 8(5): 193-198, 2004.

DARFEUILLE-MICHAUD, A., J. BOUDEAU, et al. "High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease." *Gastroenterology* 127(2): 412-421, 2004.

DATASUS. "Informações de Saúde/Estatísticas vitais." Acessado em maio de 2016. <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>.

DE SOUZA, H. L., CARVALHO, V. R., et al. "Mucosa-associated but not luminal *Escherichia coli* is augmented in Crohn's disease and ulcerative colitis." *Gut Pathog*, 4(1): 21, 2012.

DICKSVED, J., HALFVARSON, J., ROSENQUIST, M., et al. "Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease." *ISME J*, 2(7):716-727, 2008.

DONLAN, R. M. AND J. W. COSTERTON. "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." *Clin Microbiol Rev* 15(2): 167-193, 2002.

DONNENBERG, M. S. AND B. B. Finlay. "Combating enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections: the way forward." *Trends Microbiol* 21(7): 317-319, 2013.

DOUMITH, M., M. J. DAY, et al. "Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups." *J Clin Microbiol* 50(9): 3108-3110, 2012.

DUNLAP; MADIGAN; et al. "*Microbiologia de Brock.*", 10 ed. Rio de Janeiro: Editora Artmed, 2010.

ECL. "Reference Laboratory for *Escherichia coli* - Pathogenic *E. coli*." from <http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp>, 2014.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose. "*Doença das aves*". Campinas: FACTA, 2th ed. cap. 4.2,p. 457-471. 2009.

FIOCCHI, C. "Inflammatory bowel disease pathogenesis: where are we?" *J Gastroenterol Hepatol*, 30 Suppl 1: 12-18, 2015.

FRIEDMAN, S. AND R. S. BLUMBERG. "*Doença Inflamatória Intestinal*". Harrison Medicina Interna. M. G. Hill. 15ª Edição: 1779-1792, 2001.

GIRARDEAU, J. P.; DALMASSO, A.; BERTIN, Y.; et.al. "Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates." *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 1, p. 6098–6107, 2005.

HALME, L., P. PAAVOLA-SAKKI, et al. "Family and twin studies in inflammatory bowel disease." *World J Gastroenterol*, 12(23): 3668-3672, 2006.

HANAUER, S. B. "Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities." *Inflamm Bowel Dis*, 12 Suppl 1: S3-9, 2006.

HARRINGTON, S. M., E. G. Dudley, et al. "Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection." *FEMS Microbiol Lett*, 254(1): 12-18, 2006.

HENDRICKSON, B. A., R. Gokhale, et al. "Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease." *Clin Microbiol Rev*, 15(1): 79-94, 2002.

HOIBY, N., T. BJARNSHOLT, et al. "Antibiotic resistance of bacterial biofilms." *Int J Antimicrob Agents*, 35(4): 322-332, 2010.

HOVDE, O. AND B. A. MOUM. "Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: results from observational studies." *World J Gastroenterol*, 18(15): 1723-1731, 2012.

HUANG, D. B. AND H. L. DUPONT. "Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging pathogen in children." *Semin Pediatr Infect Dis*, 15(4): 266-271, 2004.

IST. Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. "*Crescimento microbiano em biofilmes*". Disponível em: <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=354>, 2005.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. "16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls." *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 2761–2764, 2007.

JEWEL, D.P. “Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease - pathophysiology, diagnosis and management”. *Ulcerative colitis*. 1735–61. 1998.

JOHNSON, J. R., P. DELAVARI, et al. "Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*." *J Infect Dis*, 183(1): 78-88, 2001.

JOHNSON, J. R., C. URBAN, et al. "Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* sequence type ST131 (O25:H4) and blaCTX-M-15 among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *E. coli* from the United States, 2000 to 2009." *Antimicrob Agents Chemother*, 56(5): 2364-2370, 2012.

KAPER, J. B., J. P. NATARO, et al. "Pathogenic *Escherichia coli*." *Nat Rev Microbiol*, 2(2): 123-140, 2004.

KARLINGER, K., T. GYORKE, et al. "The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Eur J Radiol*, 35(3): 154-167, 2000.

KAUFFMANN, F. "The serology of the *coli* group." *J Immunol*, 57(1): 71-100, 1947.

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

KOTLOWSKI, R., C. N. BERNSTEIN, et al. "High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease." *Gut*, 56(5): 669-675, 2007.

LI, D., B. LIU, et al. "A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections." *J Microbiol Methods*, 82(1): 71-77, 2010.

MACEDO, Jorge Antônio Barros. MILKNET. “Biofilmes Bacterianos: Uma Preocupação Para a Indústria de Alimentos.” Disponível em: www.milknet.com.br, 2006.

MARTINEZ-MEDINA, M., A. MORA, et al. "Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains." *J Clin Microbiol*, 47(12): 3968-3979, 2009.

MARTINEZ-MEDINA, M., P. NAVES, et al. "Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC)." *BMC Microbiol*, 9: 202, 2009.

MORGAN, X. C. AND C. HUTTENHOWER. "Chapter 12: Human microbiome analysis." *PLoS Comput Biol*, 8(12): e1002808, 2012.

MUKHOPADHYA, I., R. HANSEN, et al. "IBD-what role do Proteobacteria play?" *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(4): 219-230, 2012.

NAVES, P., G. DEL PRADO, et al. "Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains." *Microb Pathog*, 45(2): 86-91, 2008.

NDOYE, B., M. H. LESSARD, et al. "Exploring suppression subtractive hybridization (SSH) for discriminating *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 and ATCC 19257 in mixed culture based on the expression of strain-specific genes." *J Appl Microbiol*, 110(2): 499-512, 2011.

OCHMAN, H. AND R. K. SELANDER. "Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations." *J Bacteriol*, 157(2): 690-693, 1984.

PAWAR, D. M., M. L. ROSSMAN, et al. "Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces." *J Appl Microbiol*, 99(2): 418-425, 2005.

POST, J. C., N. L. HILLER, et al. "The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007." *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 15(5): 347-351, 2007.

RUSSO, T. A. AND J. R. JOHNSON. "Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC." *J Infect Dis*, 181(5): 1753-1754, 2000.

SARTOR, R. B. "Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis." *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 3(7): 390-407, 2006.

SELANDER, R. K., D. A. CAUGANT, et al. "Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics." *Appl Environ Microbiol*, 51(5): 873-884, 1986.

STENSON, W. F. "Mechanisms of tissue protection and repair in inflammatory bowel disease." *Curr Opin Gastroenterol*, 17(4): 313-317, 2001.

STENUTZ, R., A. WEINTRAUB, et al. "The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens." *FEMS Microbiol Ver*, 30 (3): 382-403, 2006.

SWIDSINSKI, A., LADHOFF, A., PERNTHALER, A., et. Al. "Mucosal flora in inflammatory bowel disease". *Gastroenterology*, 122(1):44-54, 2002.

THOMAZINI, C. M., D. A. SAMEGIMA, et al. "High prevalence of aggregative adherent *Escherichia coli* strains in the mucosa-associated microbiota of patients with inflammatory bowel diseases." *Int J Med Microbiol*, 301(6): 475-479, 2011.

TORRES, A. G., X. ZHOU, et al. "Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells." *Infect Immun*, 73(1): 18-29, 2005.

TORSVIK, V. AND L. OVREAS. "Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems." *Curr Opin Microbiol*, 5(3): 240-245, 2002.

URWIN, R. AND M. C. MAIDEN. "Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology." *Trends Microbiol*, 11(10): 479-487, 2003.

VAN HOUDT, R. AND C. W. MICHIELS. "Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation." *Res Microbiol*, 156(5-6): 626-633, 2005.

VON BAUM, H. AND R. MARRE. "Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications." *Int J Med Microbiol*, 295(6-7): 503-511, 2005.

WALK, S. T., J. M. MLADONICKY, et al. "Influence of antibiotic selection on genetic composition of *Escherichia coli* populations from conventional and organic dairy farms." *Appl Environ Microbiol*, 73(19): 5982-5989, 2007.

WEISS-MUSZKAT, M., D. SHAKH, et al. "Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain." *Appl Environ Microbiol*, 76(5): 1545-1554, 2010.

WIRTH, T., FALUSH, D., et.al. "Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective". *Mol.Microbiol.* 60(5), 1136-1151, 2006.

XAVIER, R. J. AND D. K. PODOLSKY. "Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Nature*, 448(7152): 427-434, 2007.

Advances in Microbiology
Vol.06 No.08(2016), Article ID:68692,6 pages
10.4236/aim.2016.68055

“TEMPERATURE GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS AS A VALUABLE ACCESSORY TOOL FOR ASSESSMENT OF DYSBIOSIS IN CROHN’S DISEASE”

Authors: Vanessa Rafaela de Carvalho, Rogeria Keller*, Ana Carolina da Silva Santos, Josias Rodrigues .

Affiliation: Laboratory of Medical Bacteriology, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences of the State University of São Paulo (UNESP), Brazil. Distrito de Rubião Junior, ZIP 18618-689, Botucatu SP, Brazil.

Email: josias@ibb.unesp.br

*Present address: University of western São Paulo. Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Limoeiro Presidente Prudente - SP – Brasil, ZIP 19067-175.

Received 21 June 2016; accepted 17 July 2016; published 20 July 2016

ABSTRACT

Escherichia coli and other Proteobacteria are augmented and several other bacteria are diminished in Crohn’s (CD) disease patients’ intestine. This imbalance in bacterial species composition - termed dysbiosis – seems to be determinant of CD manifestation. Since a great part of intestinal bacteria are not cultivable, detection of CD dysbiosis is accomplished by molecular tools, involving sequences analysis of the 16SrRNA gene (16SrDNA) present in the patient’s clinical samples, which can be done by sequencing or electrophoresis in denaturing gels of 16SrDNA amplicons. By analyzing, by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) and next generation sequencing of 16SV6-V8rDNA amplicons present in gram negative cultures from four distinct clinical samples of a control subject and a CD patient, this study demonstrates that both techniques were able to detect *E. coli* overgrowth and reduction in species richness in CD and that TGGE can discriminates sequences collectively labeled as “unclassified” in 16SrDNA databases.

Although TGGE per se does not identify the sequences, the discriminatory power that it confers represents valuable accessory information to next generation DNA sequencing (NGS), and as such must be used as a NGS complementary tool.

Key words: Dysbiosis, Proteobacteria, *Escherichia coli*, Crohn’s disease

1. Introduction

The human body is occupied by a diverse and abundant microbial community (microbiome), which although might include potentially pathogenic organisms, exerts innumerable homeostasis favoring functions. Health depends on maintenance of microbial diversity and abundance, so that disequilibrium in microbial species composition can lead to some disorders, such as inflammatory bowel diseases (IBD) and *Clostridium difficile*-associated pseudomembranous colitis, for which reversion or attenuation of the bacterial imbalance by, for example, the administration of probiotics [1] or fecal transplantation [2] have been viewed as promising therapeutic strategies. Thus, effort has been dedicated to identify the microbes' species that inhabit the human body, their metabolic products, and the nature of the interaction that they keep with the host.

Over 90% of body's microbes are prokaryotes belonging to the Bacteria dominium, a great part of which is as yet unknown. Existence of many microbial species has for long been ignored. This was at least in part due to limitations in culturing them, that is, to accomplish their artificial reproduction in laboratory conditions. Methods for studying microorganism are divided in those which are dependent and those which are not dependent on laboratory cultures. Culture dependent methods detect only live organisms, whereas those which are independent of culture detect live or dead, cultivable or non-cultivable organisms. Culture independent methods consist basically of molecular and serological techniques which identify bacterial extracellular products, cell associated molecules, genes or whole genome.

Progress in the study of human microbiome has relied mainly on the analysis of 16S rRNA gene (16S rDNA) sequences, one of the culture independent molecular approaches. 16S rDNA is ca. 1.5-kb in size and encodes the corresponding rRNA molecule, which is involved in protein synthesis signaling [3] and is part of all prokaryote's small ribosome subunit. It consists of 9 variable alternating with conserved sequences [4, 5]. PCR using primers combining with conserved sequences amplifies one or more 16S rDNA variable regions yielding an amplicon of a given size which contains 16S rDNA of distinct bacteria taxa. The identification of each of a specific bacterial DNA within a 16S rDNA amplicon can be done by submitting the amplicon to electrophoresis in denaturing gradient gels, where they are identified by bands of characteristic mobility. Thereafter, the bands can be cut from the gel, purified and sequenced. Traditionally, sequencing of the bands has been done with the Sanger method, but with the development of next generation technologies (NGS), 16S rDNA bacterial identification has depended less or abolished the amplicon electrophoresis in

denaturing gradient gels. This is because sequencing of 16SrDNA by NGS is more versatile, enables a larger number of samples analyses and the bacterial identification is faster, since the sequence information can be processed with tools available at databases, such as the Ribosomal Database Project [6] and Greengenes [7]. Nonetheless, since a great part of bacteria is still unknown, no information can be retrieved on the corresponding sequence from these database, other than “unassigned” or “unidentified” followed by a mention to a given taxa usually of high taxonomic level. For example, it is frequently not possible identify the number of sequences of lower taxonomic levels (family, order or genus) specified in a DNA amplicon sample as “unidentified Proteobacteria”. It is likely that by submitting this amplicon to denaturing gel electrophoresis, the corresponding unidentified sequences would be resolved in multiple bands, each corresponding to taxa of lower taxonomic levels. Therefore, denaturing gradient gel electrophoresis can give useful information in bacterial identification in the analysis of 16SrDNA amplicon and thus must be used at least as a complementary procedure to NGS. In this study, we evaluated the validity of temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) of 16SrDNA amplicons for assessing gram negative bacterial communities in clinical samples from a Crohn’s disease (CD) patient and a control subject.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial cultures

Three biopsies and one stool culture from each subject were tested. These cultures were previously originated from the patient’s gut biopsies or stools’ inoculum in MacConkey broth and re-culturing of the growth in brain heart infusion broth, where they were stocked at -80°C with 15% glycerol [8]. Cultures from *Escherichia coli*, *Shigella* sp, *Hafnia* sp, *Pseudomonas* sp, *Proteus* sp, *Providencia* sp, *Morganella* sp, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, and *Campylobacter* sp were used as references to define a temperature gradient for a good bands resolution.

2.2. DNA purification and PCR

DNA from both clinical samples and known cultures were purified with the QiAmp minikit (Qiagen, Hilden, Germany) and used as a template for a PCR targeting the V6-V8 regions of the 16SrDNA, with U968 (GAACGCGAAGAACCTTAC) plus a 40 bases GC clamp and L1401 (GCGTGTGTACAAGACCC), as forward and reverse primers, respectively. Amplification conditions as well as reaction components in the PCR mix are described elsewhere [9].

2.3. TGGE

TGGE of the 16SV6-V8rDNA amplicons was run in a 0,8 mm polyacrylamide (6% 18 [wt/vol] acrylamide/bisacrylamide [37.5:1], 8M urea, 20% [vol/vol] formamide, 2% [vol/vol] glycerol, 0.09 % [vol/vol], TEMED and 0.4% [vol/vol] ammonium persulfate) gel in a TGGE mini system (Biometra, Göttingen, Germany) for 2h at 130V, with 1x TAE as the running buffer. Following electrophoresis, the gel was fixed, silver stained according to the TGGE mini system manufacturer's protocol, dried at room temperature and submitted to image capturing at the Gel doc EZ Imager (Biorad, Hercules, USA). Determination of the best gradient temperature for TGGE separation of the bands was carried out by submitting to electrophoresis, in a single well gel, a pool resulting from the mixture of individual reference bacterial cultures amplicons, under a steep 30°C-50°C gradient perpendicular to the running electrophoresis direction. This procedure enabled the identification of 40°C-44°C as the temperature interval where the amplicons were separated (Figure 1). After submitting these reference cultures amplicons to electrophoresis, where the gradient temperature was applied in parallel to the electrophoretic run, this gradient was confirmed as the parameter for the best resolution of the bands. Therefore, the above defined 40°C-44°C temperature interval was used as a gradient in a TGGE to compare bacterial diversity in 16SV6-V8rDNA amplicons from CD patient's and control's samples cultures. Gel manufacture, as well as voltage and time of the run were as described above.

2.4. 16SrDNA amplicons sequencing

Amplicons from the 16SV6rDNA gram negative cultures from two each of the control and 3 CD patient's biopsies were sequenced using the IonTorrent NGS platform. The resulting sequences were then compared with previously deposited reads at the RDP data base [6], for taxa identification. PCR protocol and primers for the 16SV6rDNA gene amplification followed the work of Andersson et al [5].

3. Results

3.1. TGGE band profiles of amplicons from the CD and control patient

As can be seen on Figure 2, there was a clear difference in DNA bands profile from control and CD patient's gram negative cultures, both in stools and biopsies samples. Except for stools, all other CD patient's samples yielded a single and intense band, with a mobility corresponding to *E. coli*, whereas all samples from control subject had multiple bands.

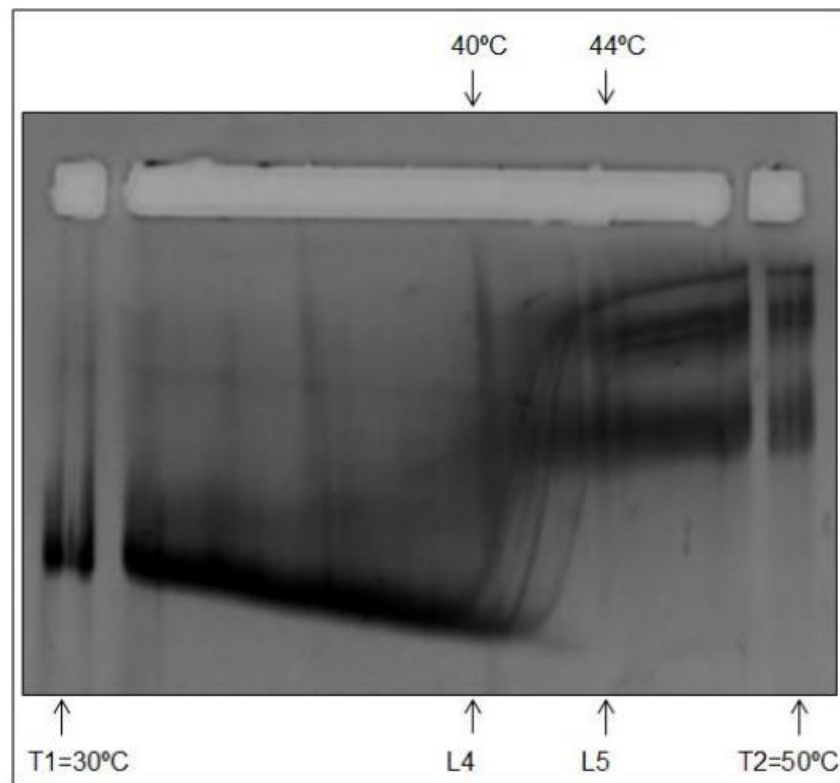


FIG 1

Figure 1. Perpendicular temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) of reference gram negative bacterial cultures mixture (see text) of 16SV6-V8rDNA amplicons in a 30°C - 50°C temperature gradient, showing the gradient (40°C - 44°C) where the bands were separated.

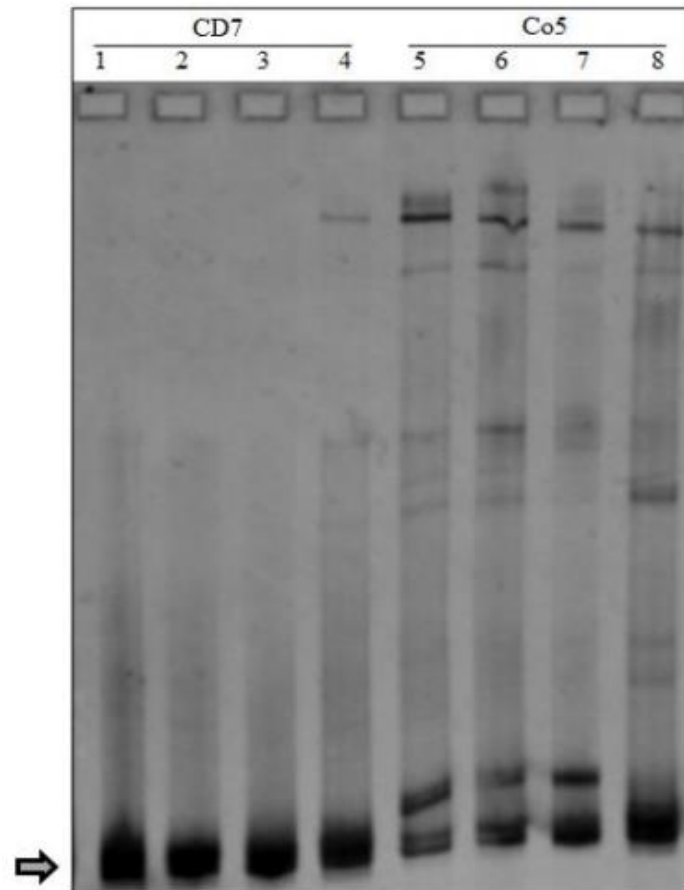


FIG 2

Figure 2. TGGE of 16SV6-V8rDNA amplicons of cultures from clinical materials originally grown on MacConkey broth of a Crohn's disease (CD7) patient and a control (Co5) subject. Arrow indicates bands with a electrophoretic mobility matching *E. coli*.

Noticeably, in the control's samples, the band matching *E. coli* was much less intense, indicating the presence of a fewer amount of these bacteria's 16SV6-V8rDNA (Figure 2).

3.2. Bacterial identification

As shown in Figure 3, the proportion of sequences assigned to *Escherichia coli*/*Shigella* in the control's cultures was inferior to that seen in cultures of CD patients' biopsies revealing an enrichment of these bacteria in CD, relative to other Enterobacteriaceae. The sequenced 16SV6rDNA was from biopsies of the same control patient (Co5) of whom 16SV6-V8 rDNA were analyzed by TGGE. The number of bacterial categories assigned to this patient in Figure 3 is inferior to the number of corresponding DNA bands in TGGE (Figure 2). Since the higher proportion of non *E. coli* reads in Figure 3 correspond to

unclassified Enterobacteriaceae, at least some of the bands in TGGE possibly represent taxa of this group which were indiscriminate by sequencing.

4. Discussion

The above results indicate that TGGE of 16SrDNA amplicons can give a good panoramic view of bacterial biodiversity in a clinical sample, enabling comparative analyses and dysbiosis assessment in IBD cases. In studies where the aim is just to get an overview picture of microbiome, without taxa identification, TGGE seems to be the tool of choice, since it may detect 16SrDNA reads which otherwise in analysis of sequencing data in publicly available database would be collectively grouped as “unidentified” or “unclassified”. An additional advantage of TGGE over sequencing is its cost-effectiveness, which becomes particularly evident when the intended analysis focuses on a specific group of bacteria, instead of all species in a microbial community, because the samples can be run in the “mini” version of the TGGE system, which requires a small gel and a lower run time.

That was the case of the present study, centered on gram negative, mostly Enterobacteria. A rise in the abundance of *E. coli* – the principal representative of Enterobacteriaceae – is a marker of dysbiosis in CD patients’ gut [10], which apparently, as shown in Figure 3, is linked to the displacement of other unclassified members of this family.

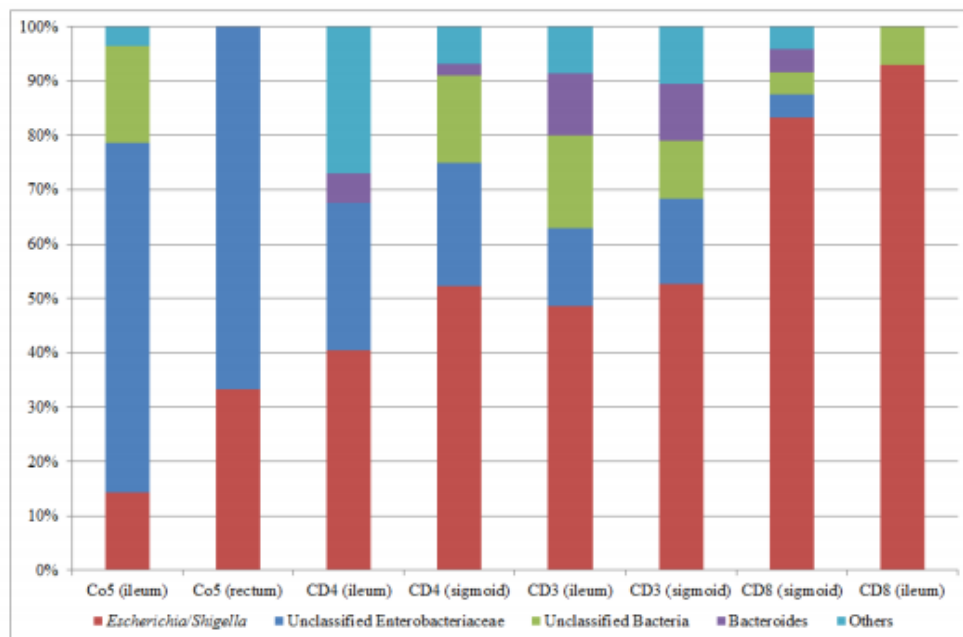


FIG 3

Figure 3. Relative abundance of distinct bacteria taxa in biopsies samples from a control subject (Co5) and 3 CD patients (CD3, CD4, and CD8) as detected by Ion torrent sequencing of 16SV6rDNA amplicons.

However, the technique has also its limitations, the most evident of which seem to be occasional lack of data reproducibility due to gel manufacture and silver staining variations. In any case, taking in account all of the above observations, the TGGE based approach for bacterial diversity assessment can be used at minimum as a supporting analytical tool to 16SrDNA sequencing.

Acknowledgement

This work was supported by Fapesp Grant 2013/04475-3 given to J.R.

References

- [1] Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukas, M., Fixa, B., Kascak, M., Kamm, M. A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C. and Schulze, J. (2004) Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*, 53,1617-1623.
- [2] Borody, T. J., Warren, E. F., Leis S., Surace, R., Ashman, O. (2003) Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 37:42-247.
- [3] Snyder, L., Peters, J. E. , Henkin, T.M., and Champness, W. (2013) *Molecular Genetics of Bacteria*, Fourth Edition, American Society of Microbiology, Washington. <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817169> 6
- [4] Neefs, J.M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S., and De Wachter, R. (1993) Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Research*, 21, 3025-3049.
- [5] Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Backhed, F., Nyren, P., and Engstrand, L. (2008) Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PloS one*, 3, e2836. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002836>
- [6] Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., and Tiedje, J. M.. (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42, D633-642. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1244> 16
- [7] DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., 17 Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., and Andersen, G. L. Greengenes, a chimera-checked 16S

rRNA gene database and workbench compatible with ARB. (2006) *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5069-5072.

[8] de Souza, H. L., de Carvalho, V. R., Romeiro, F. G., and Rodrigues J. (2012) Mucosa-associated but not luminal *Escherichia coli* is augmented in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut pathogens*, 4, 21. <http://dx.doi.org/10.1186/1757-4749-4-21>

[9] Zoetendal, E. G., Akkermans, A.D., and De Vos, W. M. (1998) Temperature 1 gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3854-3859.

[10] Agus, A., Massier, S., Darfeuille-Michaud, A., et al. (2014) Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies. *BioMed Research International*, 2014, 567929. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/567929>