

Luan Beloto Leme

**Características de adesão de cepas de *Escherichia coli* isoladas de
pacientes com Doença Inflamatória Intestinal**

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências
de Botucatu, Universidade Estadual Paulista
“ Julio de Mesquita Filho ”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Graduado em Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado.

Orientador: Josias Rodrigues

Botucatu
2013

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

Leme, Luan Beloto.

Características de adesão de cepas de Escherichia coli isoladas de pacientes com doença inflamatória intestinal / Luan Beloto Leme. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas - Bacharelado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Josias Rodrigues Capes:
21202010

1. Crohn, Doença de. 2. Intestinos - Doenças inflamatórias. 3. Escherichia coli.
4. Proctocolite.

Palavras-chave: Doença de Crohn; Doença inflamatória intestinal; Escherichia coli; Retocolite ulcerativa; Teste de adesão.

Agradecimentos

- Agradeço acima de tudo à Deus.

- Agradeço aos meus pais por sempre me apoiarem incondicionalmente.

- Agradeço à todos os docentes, discentes e funcionários do Dep. De Microbiologia e Imunologia que sempre me ajudaram.

- Agradeço especialmente ao Prof. Josias que confiou em mim, abrindo as portas do seu laboratório e me dando a oportunidade de realizar esse trabalho, me aceitando mesmo em condições difíceis, sendo um verdadeiro mestre e me ajudando a adquirir conhecimento técnico e a evoluir pessoalmente e que, principalmente, continua sendo um amigo.

Resumo

Características de Adesão de cepas de *Escherichia coli* isoladas de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal. **Leme, L.B.**

A Doença Inflamatória Intestinal atinge uma grande parcela da população mundial e é uma doença com causa multifatorial, duas formas clínicas são reconhecidas atualmente: A Doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa. Muitos estudos relacionam o diagnóstico de DII com um aumento na quantidade da bactéria *Escherichia coli*, mas ainda não é possível dizer certamente se esse aumento na população de *E. coli* é causa ou consequência da doença. As *Escherichia coli* com o padrão de adesão agregativo são encontradas em pacientes com a Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa e o presente estudo irá investigar esse comportamento através do teste de adesão com incubação de 3 horas. A distribuição média dos índices de aderência não apresentam uma diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com Doença de Crohn (60%), Retocolite Ulcerativa (40%) e o grupo controle (60%). Assim, obtivemos resultados conflitantes com o esperado pela literatura, não foi observado um aumento na prevalência de testes positivos de aderência nos pacientes diagnosticados com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa em relação ao grupo controle.

Palavras-chave: Doença de Crohn; Retocolite Ulcerativa; Doença Inflamatória Intestinal; *Escherichia coli*; Teste de Adesão

Lista de gráficos

Gráfico 1- Box plot referente à *E. Coli* segundo diagnóstico.

Gráfico 2 – Box plot referente à % de aderentes segundo diagnóstico.

Gráfico 3- Diagrama de dispersão entre a quantidade de bactérias *E. Coli* e à porcentagem de aderência das amostras.

Lista de tabelas

Tabela 1 – Material clínico utilizado.

Tabela 2- Tabela de relação entre porcentagem de resultados positivos dos testes bioquímicos com o diagnóstico.

Tabela 3- Mediana, 1^o e 3^o quartil, referentes à quantidade de *E. Coli*, segundo diagnóstico.

Tabela 4- Mediana, 1^o e 3^o quartil, referentes à % de aderência, segundo diagnóstico.

Lista de abreviações e siglas

AA – Adesão Agregativa

AD – Adesão Difusa

Cont – Grupo controle de pacientes

DAEC – *E. coli* de adesão difusa

DC - Doença de Crohn

DII – Doença Inflamatória Intestinal

E. coli – *Escherichia coli*

EAEC – *E. coli* enteroagregativas

ECD – *E. coli* diarreiogênicas

EHEC – *E. coli* enterohemorrágicas

EIEC – *E. coli* enteroinvasoras

EPEC – *E. coli* enteropatogênicas

ETEC – *E. coli* enterotoxigênicas

GEDIIB - Grupo de Estudos da Doença Inflamatória Intestinal do Brasil

NA – Não Aderentes

RU - Retocolite Ulcerativa

SUS - Sistema Único de Saúde

Sumário

Resumo	
1. Introdução	1
1.1. <i>Escherichia coli</i>	1
1.2. Doença Inflamatória Intestinal (DII)	2
1.3. Associação entre <i>E. coli</i> e DII	3
2. Objetivo	6
3. Material e Métodos	7
3.1. Material Clínico	7
3.2. Isolamento e identificação das colônias de <i>E. coli</i> dos Pools	7
3.2.1. Teste Bioquímico	8
3.3. Células HEp – 2 e Teste de Adesão	9
3.3.1. Manutenção das células HEp – 2 e preparo das placas	9
3.3.2. Teste de Adesão	9
3.4. Soluções, Reagentes e Meios de Cultura	10
3.4.1. Utilizados para Isolamento das bactérias e Identificação colônias <i>E. Coli</i>	10
3.4.1.1. Meios: Agar Nutriente – inclinado, Simmons	10
Citrate Agar e Brilliance <i>E. Coli</i>/Coliform Selective Medium	10
3.4.1.2. Meio MILI	10
3.4.1.3. Meio EPM	11
3.4.2. Utilizados para manutenção das células HEp-2 e Teste de Adesão	12
3.4.2.1. Tampão Sorensen (ph 7,3)	12
3.4.2.2. D-Manose à 20%	12
3.4.2.3. MEM	12
3.4.2.4. PBS	13
3.4.2.5. Meio BHI	13
4. Resultados	14
4.1. Identificação das bactérias e Isolamento das colônias de <i>E. Coli</i>	14
4.2. Testes de Adesão	15

5. Discussão.....	18
6. Conclusão.....	20
7. Referências Bibliográficas.....	21

1. Introdução

1.1. *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria em formato de bacilo Gram negativo, que é uma das mais comuns e mais antigas bactérias simbiotes do ser humano. *E. coli* pertence à família Enterobacteriaceae são aeróbias e anaeróbias facultativas. O seu habitat natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Possui múltiplos flagelos dispostos em volta da célula. A *E. coli* é um dos poucos seres vivos capazes de produzir todos os componentes de que são feitos, a partir de compostos básicos e fontes de energia suficientes. O seu nome vem do descobridor, Theodor Escherich (1857-1911), um médico alemão-austriaco nascido na Baviera. A descoberta ocorreu em 1885 e o seu nome foi dado à bactéria em 1919 (MURRAY, 2004; TRABULSI, 2008).

Existem, enquanto parte da microbiota normal no intestino, em grande número. Cada pessoa evacua em média, com as fezes, um trilhão de bactérias *E.coli* todos os dias. A doença é devida à disseminação, noutros órgãos, das estirpes intestinais normais; ou nos casos de enterite à invasão do lúmen intestinal por estirpes diferentes daquelas normais no indivíduo. A estirpe de *E.coli* que existe normalmente nos intestinos de um determinado indivíduo é bem conhecida e controlada pelo seu sistema imunológico, e raramente causa problemas excepto quando há debilidade do indivíduo. A maioria das doenças é devido a *E.coli* vindas de indivíduos diferentes e portanto de estirpe diferente, não reconhecida pelos linfócitos (MURRAY, 2004; TRABULSI, 2008).

Em termos quantitativos, *E. coli* provavelmente seja o patógeno humano mais importante. A diversidade patogênica de *E. coli* chega a ser fantástica. A espécie compreende pelo menos cinco categorias de amostras que causam infecção intestinal por diferentes mecanismos e várias outras especificamente associadas com infecções urinárias, meningites e provavelmente outras infecções extra-intestinais. As categorias que causam infecção intestinal são coletivamente chamadas de *E. coli* diarreio-gênica (MURRAY, 2004; TRABULSI, 2008).

De modo geral, as *E. Coli* diarreio gênicas (ECD) podem ser agrupadas em *E. Coli* aderentes, *E. Coli* não aderentes e *E. Coli* invasoras. Do primeiro grupo, fazem parte as *E. Coli* enteropatogênicas (EPEC), as *E. Coli* enteroagregativas (EAEC), as *E. Coli* de adesão difusa (DAEC) e as *E. Coli* enterohemorrágicas (EHEC). Como não aderentes, são identificadas as *E. Coli* enterotoxigênicas (ETEC) e, como invasoras, as *E. Coli* enteroinvasoras (EIEC).

Três principais fatores de virulência tem sido identificados como a causa de diarreia por *E. Coli*: produção de enterotoxinas (em ETEC e EAEC); invasão de células eucarióticas (em EIEC) e adesão íntima à membrana celular de células eucarióticas (em EPEC e EHEC) (MURRAY, 2009).

1.2. Doença Inflamatória Intestinal (DII)

No Brasil, a Doença Inflamatória Intestinal é uma doença crônica e de alto custo. O uso crônico e oneroso das drogas acarreta importante impacto socioeconômico para o Sistema Único de Saúde (SUS) que libera medicação para milhares de pacientes. A prevenção e o desenvolvimento do estudo sobre as causas e manifestações das DII no Brasil são de extrema urgência (GEDIIB).

Doença inflamatória intestinal (DII) são manifestações crônicas idiopáticas no trato digestório, sem causas totalmente determinadas. Os sintomas incluem: diarreia, dor abdominal, cólica com náuseas e vômitos, febre moderada, sensação de distensão abdominal que piora com as refeições, perda de peso, mal-estar geral e cansaço. A doença varia entre períodos ativos e outros sem sintomas (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002; STROBER; FUSS; MANNON, 2007). A doença pode atingir outros tecidos além do intestinal (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002). Duas formas clínicas da DII são reconhecidas atualmente: a Retocolite Ulcerativa (RU) e a Doença de Crohn (DC).

A Doença de Crohn (DC) caracteriza-se por uma inflamação transmural assimétrica, que afeta qualquer porção do trato gastrointestinal, embora o íleo e o cólon direito sejam mais acometidos (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002). As áreas

afetadas apresentam fístulas, que podem ocorrer isoladamente ou em associação com outras doenças, causando o aumento da probabilidade de infecções recorrentes (STROBER; FUSS; MANNON, 2007). Eventualmente, pode haver complicações mais graves tais como obstrução intestinal e câncer de cólon.

A Retocolite Úlcerativa (RU) é uma doença que se manifesta como uma inflamação difusa, contínua e superficial que resulta em edema, ulcerações e hemorragia. Esta inflamação é limitada apenas ao cólon e reto, e normalmente começa no reto e se estende até um nível proximal variável (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002; STROBER; FUSS; MANNON, 2007). As manifestações clínicas da doença são: diarreia com sangue, muco e pus, febre, mal-estar geral, fraquezas, cólicas e dores abdominais. Necessidade imediata ou urgência em evacuar, perda do controle esfinteriano e dor ocorrem devido à inflamação do reto (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002; STROBER; FUSS; MANNON, 2007).

Indivíduos de qualquer sexo ou faixa etária podem ser acometidos por ambas as manifestações. Porém, uma maior prevalência entre indivíduos com idade entre 15 à 25 e 45 à 55 anos tem sido observada. Embora ocorra em todo o mundo, a DII é mais comum em alguns países desenvolvidos como a América do Norte e o Norte Europeu (ANDUS e GROSS, 2000; WHELAN, 1990; GEDIIB). Ninguém sabe exatamente as causas da Doença Inflamatória Intestinal, ou por que algumas pessoas são portadoras dessa doença e outras não (ANDUS e GROSS, 2000; HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002). Fatores genéticos, imunológicos e ambientais interagem de um modo muito complexo, levando a reação imunológica exagerada (FIOCCHI, 2005) responsável pelos sintomas observados. Estudos sobre os fatores ambientais mostram que o tabagismo e a dieta tem possível relação com a DII, porém nenhum deles como causa única da doença (ANDU; GROSS, 2000., FIOCCHI, 1998.).

1.3. Associação entre *E. coli* e DII

A microbiota intestinal é tão diversa e tão complexa que pode até ser considerada um órgão funcionalmente ativo, com um potencial metabólico ainda não completamente reconhecido (HOOPER, 2004; NOVERR e HUFFNAGLE, 2004). Pacientes com DII tem

alteração no equilíbrio da microbiota intestinal (BARNICH e DARFEUILLE-MICHAUD, 2007; GUARNER, 2005; MYLONAKI et al., 2005). Foi relatado a predominância da *E. coli* sobre todas as outras bactérias da microbiota em pacientes com DC (MASSERET et al., 2001).

A *E. coli* faz parte naturalmente da microbiota intestinal dos seres humanos com suas funções e trazendo diversos benefícios. Mas quando o organismo está desequilibrado ou debilitado, estas *E. coli* nativas e outras cepas de *E. coli* patogênicas encontradas transitoriamente no trato gastrointestinal, podem provocar um grande número de infecções, variando de meningite à infecções entéricas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO e KAPER, 1998).

Como aeróbio facultativo dominante, *E. coli* tem sido o foco natural de estudos para investigar uma suposta origem infecciosa para DII (COOKE et al., 1974). A atenção a estas bactérias se tornou crescente a partir da descoberta que seu número é aumentado em portadores da doença (KOTLOWSKI et al., 2007; SEKSIK et al., 2003). No entanto, dado à versatilidade da interação da espécie com o homem, não está claro, se o número excedente de *E. coli* compreende cepas da microbiota residente ou inclui cepas patogênicas, que contribuem para os sintomas da DII.

O envolvimento de *E. coli* e outras bactérias da microbiota intestinal com a DII pode também ser sugerido pela coincidência dos sítios de lesões e localização da microbiota intestinal (GIONCHETTI; RIZZELO; CAMPIERI, 2001). Não somente as ulcerações são mais numerosas, mas as alterações patológicas são mais intensas em sítios do cólon onde a densidade bacteriana é maior. Nos procedimentos de lavagem intestinal ou administração de drogas antibacterianas a pacientes com DC, os sintomas parecem regredir com a diminuição do nível luminal de bactérias (BARNICH e DARFEUILLE-MICHAUD, 2007).

Diferentes patótipos de *E. coli* diarreiogênicas causam sintomas entéricos muito particulares, que são intimamente relacionados com suas estratégias de virulência (NATARO e KAPER, 1998). A capacidade de adesão a modelos celulares é uma característica compartilhada por linhagens patogênicas e comensais. Entretanto, elas

podem ser distinguidas pelo fenótipo de adesão que elas apresentam: Adesão agregativa, Adesão Difusa ou Adesão Localizada (NATARO; KAPER, 1998.). Este trabalho é focado no patótipo diarreiogênico *E. coli* enteroagregativa (EAEC), que pode ser especialmente importante porque está epidemiologicamente associado com diarreia persistente em crianças e adultos, principalmente de países em desenvolvimento (NATARO e KAPER, 1998). EAEC aderem fortemente a células HEp-2, em arranjos que assemelham-se a tijolos empilhados, num padrão referido como agregativo (AA). Este fenótipo tem sido atribuído à presença das fímbrias de aderência agregativa do tipo I e II (AAF I/II) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004) e outras adesinas ainda não descritas. Quanto à patogênese, EAEC caracteristicamente induzem um aumento na secreção de muco, sob o qual as bactérias ficam protegidas formando um biofilme que impede a absorção de nutrientes e promove a colonização persistente do intestino (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Vários estudos têm levantado uma hipótese de que *E. coli* aderentes contribuem para a patogênese da DII (BARNICH e DARFEUILLE-MICHAUD, 2007). O objetivo deste trabalho é testar essa hipótese.

2. Objetivos

Relacionar o tipo da doença dos pacientes com a quantidade de bactérias Gram – por amostra e com o padrão de adesão às células epiteliais HEp-2 das *E. coli* isoladas de cada material clínico utilizando meio com D-manose na concentração de 1%.

3. Material e Métodos

3.1. Material Clínico

O estudo foi feito em culturas de caldo MacConkey de diferentes materiais clínicos de portadores de Doença Inflamatória intestinal.

Foi utilizado material coletado no Hospital das Clínicas de Botucatu durante o exame de Colonoscopia realizado nos anos 2011 e 2012. Foram coletadas amostras de diversos segmentos do intestino dos pacientes (Ascendente, Ceco, Descendente, Fezes, Íleo, Reto, Sigmoide e Transverso) com a Doença de Crohn, Retocolite Ulcerativa e demais pacientes agrupados como controle.

Material Clínico	DC	RU	CONTROLE
Ascendente	8	8	13
Ceco	3	0	2
Descendente	3	3	12
Fezes	11	7	16
Íleo	7	5	8
Reto	6	1	7
Sigmóide	8	4	3
Transverso	2	0	1

Tabela 1 – Material clínico utilizado.

Um total de 138 culturas (37 pacientes) foram estudadas, 62 (16 pacientes) controles, 48 (13 pacientes) DC e 28 (8 pacientes) RU.

Estas amostras estavam guardadas congeladas no freezer -70 em cultura MacConkey com Glicerol (SOUZA, H. L. et al., 2012).

3.2. Isolamento e identificação das colônias de *E. coli* dos Pools.

Estas amostras foram descongeladas em temperatura ambiente até retornarem ao estado líquido, posteriormente foram semeadas em placas de meio Brilliance E. Coli/Coliform Selective Medium (CM1046 OXOID), o qual é um meio à base de Cromo e é possível identificar as possíveis colônias de *E. Coli* pela coloração arroxeada.

Essas placas foram incubadas na estufa à 37.C por 24 horas.

Foram escolhidas 5 colônias arroxeadas ao acaso, procurando pegar as mais distantes entre si. Então estas 5 colônias foram transferidas individualmente para os meios Simmons Citrate Agar (BBL), MILI e EPM.

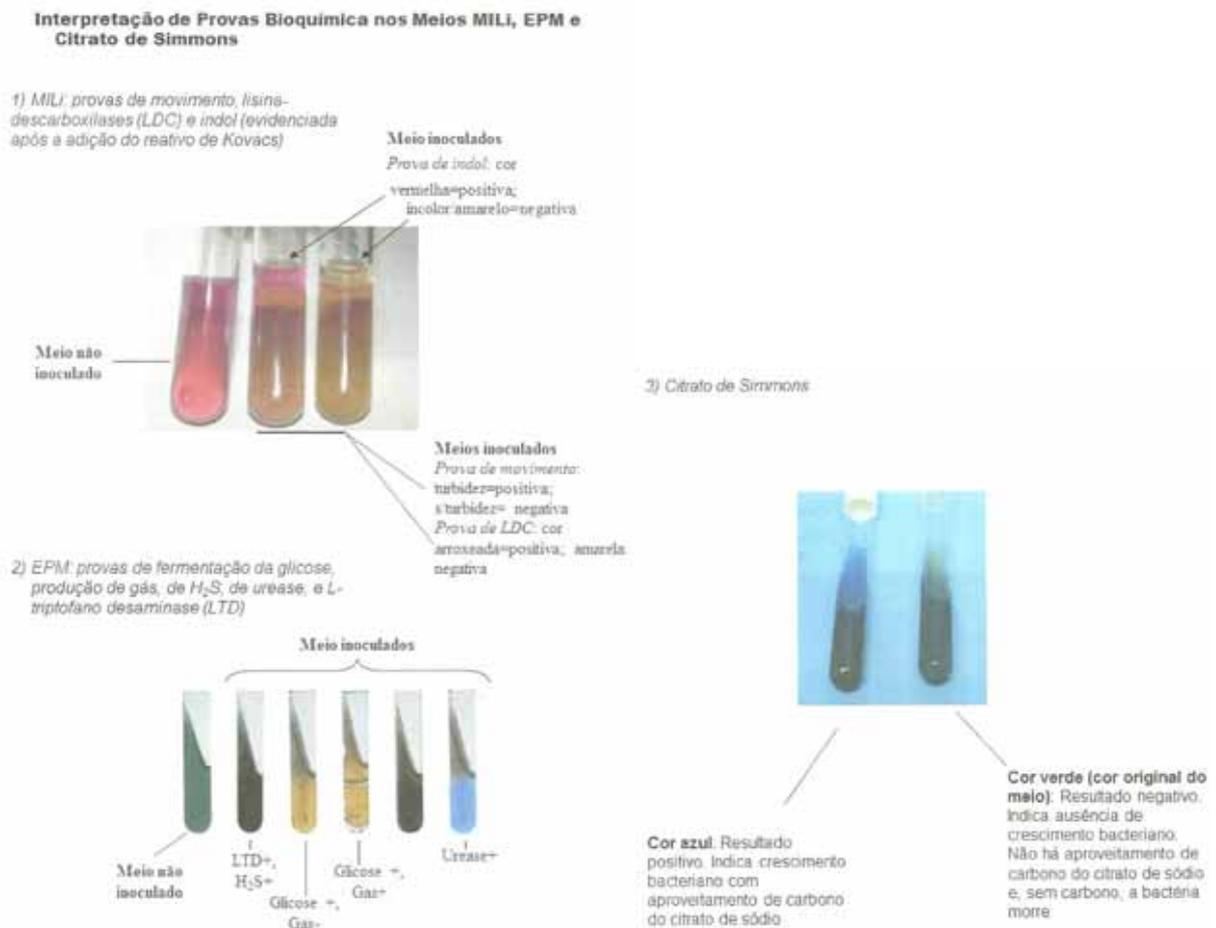
Os 3 meios inoculados foram incubados na estufa à 37.C por 24 horas.

Posteriormente foram realizados 9 provas bioquímicas (3.2.1) nesses meios com o objetivo de identificar quais bactérias foram isoladas, as que confirmarem ser *E. Coli* foram transferidas do meio EPM para tubos do meio Agar Nutriente – inclinado.

Os tubos de Agar Nutriente – inclinado inoculados foram incubados na estufa à 37.C por mais 24 horas.

Após esse período as amostras de *E. Coli* já cresceram, tornando possível tampar os tubos com rolhas estéreis e armazenar.

3.2.1 Teste Bioquímico



Perfil Bioquímico e Motilidade de Algumas Enterobactérias

Prova	<i>E. coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Edwardsiella ickhachi</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Providencia rettigeri</i>
Citrato	-	-	-	+ ou -	+	+	+	+	+ ou -	+ ou -	-	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gás	+ ou -	-	+	+	+	+	+	+ ou -	+	+ ou -	+ ou -	+ ou -
Urease	-	-	-	-	+ ou -	+	+ ou -	+ ou -	+ ou -	+	+	+
H ₂ S	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
LTD*	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Motilidade	+ ou -	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+ ou -	+
Lisina	+ ou -	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Indol	+	+ ou -	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Lactose	+	-	-	-	+ ou -	+	+ ou -	-	-	-	-	-

*LTD = L-triptofano desaminase

3.3. Células HEp - 2 e Teste de Adesão

3.3.1. Manutenção das células HEp - 2 e preparo das placas:

As células foram mantidas em meio MEM (Minimum Essential Medium Eagle, M0643 Sigma-Aldrich) com a adição de SFB (Soro Fetal Bovino) à 10% e 3 antibióticos, foram tripsinizadas e sua concentração ajustada para 10⁵ células/ml. Volumes de 1ml da suspensão foram transferidos para cada um dos 24 pequenos pocinhos da placa contendo lamínulas estéreis, onde as células foram cultivadas até a formação de uma monocamada completa (confluência total).

3.3.2. Teste de Adesão:

O meio de cultura foi retirado de todos os pocinhos da placa com a ajuda de uma bomba de vácuo e a monocamada de células foi lavada 3 vezes com PBS (Phosphate Buffered Saline). 1ml do meio MEM com D-Manose (M4625 Sigma) na concentração de 1% e com o acréscimo de SFB à 10% (sem antibiótico) foi colocado em cada poço e, em seguida, 20ul de cultura bacteriana crescida em meio BHI (Brain Heart Infusion CM0225 OXOID) por 24 horas foram acrescentados. A placa foi incubada por 3 horas em estufa própria de cultura de células à 37.C. Após esse período, o meio de cultura foi novamente retirado com a ajuda da bomba de vácuo e os pocinhos lavados com PBS 3 vezes. Em seguida, as preparações foram fixadas com 1ml de metanol por um período mínimo de 40 minutos, coradas por 10 minutos com preparado de May-Grunwald e por 30 minutos

com preparado de Giemsa. Os pocinhos da placa foram lavados com água corrente e a placa foi posta para secar.

Depois de secas, as lamínulas foram retiradas da placa, montadas em lâminas e observadas ao microscópio.

3.4. Soluções, Reagentes e Meios de cultura

3.4.1. Utilizados para a identificação das bactérias e isolamento das colônias de E. Coli

3.4.1.1. Meios: Agar Nutriente – inclinado, Simmons Citrate Agar e Brilliance E. Coli/Coliform Selective Medium

Foram preparados misturando o pó em água destilada, misturado enquanto esquentado o meio até ficarem homogêneos e autoclavados à 120° C. Os 2 primeiros meios deve-se após serem retirados da autoclave inclinar os meios, o 3 meio deve ser colocado em placas logo após sair da autoclave em condições estéreis.

3.4.1.2. Meio MILI

Extrato de levedura	3 g
Peptona	10 g
Triptona	10 g
L-lisina	10 g
Glicose	1 g
Agar	2 g
Bromocresol púrpura 0,2%	10 ml
Água destilada (q.s.p.)	1.000 ml

Todos os elementos são adicionados à água destilada, sendo a mistura aquecida à ebulição, até dissolução completa. O meio, em volume de 5 ml, é distribuído em tubos 12x120 mm e esterilizado durante 15 minutos, à 121.C, deixando-se solidificar em posição vertical. O pH final deve ser de 6,5 à 25.C.

3.4.1.3. Meio EPM

- Base

Triptona	10 g
Extrato de Carne	2 g
Cloreto de Sódio	5 g
Fosfato de Sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ .5H ₂ O)	2 g
L-Triptofano	1 g
Azul de bromotimol 1,5%	2 ml
Agar	11 g
Água destilada (q.s.p.)	1.000 ml

- Preparo:

Adicionar todos os componentes à água (em volume inferior ao volume total). Aquecer a mistura até a completa dissolução e ajustar o pH à 6,7. Completar o volume e esterilizar o meio à 121.C por 20 minutos.

- Solução de indicador e substratos

Citrato de ferro amoniacal	2 g
Tiosulfato de sódio (Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O)	2 g
Glicose	10 g
Água destilada (q.s.p.)	

- Preparo:

A mistura é aquecida em banho-maria à 65.C, com agitação constante, até a dissolução completa e esterilizada à mesma temperatura durante 1 hora.

- Preparo Final

Após resfriar a base a até 65.C aproximadamente, adicionar a solução contendo os indicadores e substratos, em condições assépticas. O meio final é distribuído em volumes de 4 ml em tubos de 12x120 mm, previamente esterilizados,

deixando-se solidificar em posição inclinada, de modo a se obter uma base de pelo menos 3,5 cm. Fazer o teste de esterilidade. O meio pronto apresenta cor verde.

3.4.2. Utilizados para manutenção de células HEp - 2 e Teste de Adesão

3.4.2.1. Tampão Sorensen (pH 7.3)

- Solução A

KH₂PO₄ 0,6356 g

Água destilada estéril (q.s.p.) 70 ml

- Solução B

NA₂HPO₄ 2,3675 g

Água destilada estéril (q.s.p.) 250 ml

As duas soluções foram autoclavadas à 120.C e misturadas em condições estéreis. A solução final foi armazenada na geladeira.

O corante May-Grunwald foi diluído na proporção 1:2 (v/v) e o corante Giemsa foi diluído na proporção 1:3 (v/v). Em seguida, foram filtrados em papel filtro e imediatamente utilizados.

3.4.2.2. D-Manose à 20%

Preparada, dissolvendo-se 20 g de pó em 100 ml de água destilada. Depois de misturada, a solução foi esterilizada por filtração em membrana de milipore de 0,22um e armazenada à 4.C.

3.4.2.3. MEM

O meio MEM foi preparado a partir da dissolução, em água Milli-Q, de pó adquirido da Sigma, na proporção de 9,7 g/l. Inicialmente, o pó foi adicionado a um béquer contendo 900 ml de água, sendo a mistura submetida à agitação até a completa dissolução do mesmo. Em seguida, foram acrescentados 2,2 g de bicarbonato de sódio e

o pH ajustado para um valor entre 0,1 à 0,3 unidades abaixo do pH ideal, que é de 7,2. Esta redução foi necessária porque o pH aumenta durante a filtração. Após ajuste final do pH, o volume foi completado e imediatamente o meio foi filtrado à vácuo em sistema de millipore (esterilizado) com membrana de 0,22µm.

Depois de comprovada sua esterilidade, foram acrescentados 10% de SFB (Cultilab) ao meio MEM. O MEM + SFB foi utilizado tanto para a manutenção das culturas celulares quanto para o teste de adesão. No primeiro caso, foi acrescentado de antibióticos (penicilina e estreptomicina = 4% e anfotericina B = 3 µg/ml) e, para o teste de adesão, apenas D-manose à 1%

3.4.2.4. PBS

NaCl	8 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Água deionizada (q.s.p.)	1.000 ml

Após o preparo a solução deve ser esterilizada à 120.C e mantida na geladeira.

3.4.2.5. Meio BHI

É preparado dissolvendo-se o pó em água destilada, o meio deve ser esquentado e misturado até ficar homogêneo e autoclavado à 120.C para ser armazenado na geladeira.

4. Resultados

4.1 Identificação das bactérias e Isolamento das colônias de *E. Coli*

Foram isoladas 503 colônias de *E. Coli* de 78 amostras pertencentes à 23 pacientes.

Das 203 colônias de *E. Coli* isoladas dos pacientes com diagnóstico de DC 96,6% (196 colônias) apresentaram resultado positivo ao teste da Lisina, 84,8% (172 colônias) apresentaram resultado positivo ao teste do Movimento e 86,2% (175 colônias) apresentaram resultado positivo ao teste do Gás.

Das 137 colônias de *E. Coli* isoladas dos pacientes com diagnóstico de RU 84,7% (116 colônias) apresentaram resultado positivo ao teste da Lisina, 76,7% (105 colônias) apresentaram resultado positivo ao teste do Movimento e 73% (100 colônias) apresentaram resultado positivo ao teste do Gás.

Das 163 colônias de *E. Coli* isoladas dos pacientes com diagnóstico de DC 97,6% (159 colônias) apresentaram resultado positivo ao teste da Lisina, 82,9% (135 colônias) apresentaram resultado positivo ao teste do Movimento e 85,3% (139 colônias) apresentaram resultado positivo ao teste do Gás.

Tabela 2- Tabela de relação entre porcentagem de resultados positivos dos testes bioquímicos com o diagnóstico.

Diagnóstico*	Lisina	Movimento	Gás	Total de Amostras
DC	196 (96,6)	172 (84,8)	175 (86,2)	203
RU	116 (84,7)	105 (76,7)	100 (73)	137
Controle	159 (97,6)	135 (82,9)	139 (85,3)	163

*DC: Doença de Crohn; RU: Retocolite Ulcerativa; Controle: Demais pacientes.

** Entre parênteses a porcentagem de amostras com resultado positivo.

Não foram encontradas diferenças significativas entre a porcentagem de resultados positivos para os 3 testes e os diagnósticos dos pacientes.

4.2 Testes de Adesão

Foram analisadas 53 amostras pertencentes à 19 pacientes com DC, RU e Controles.

Estudamos estas amostras referentes às quantidades de bactérias *E. Coli* em cada amostra e ao comportamento das *E. Coli* após realizarmos o Teste de Adesão de 3 horas em células HEp-2 tratadas com D-Manose à 20%.

Metodologia Estatística

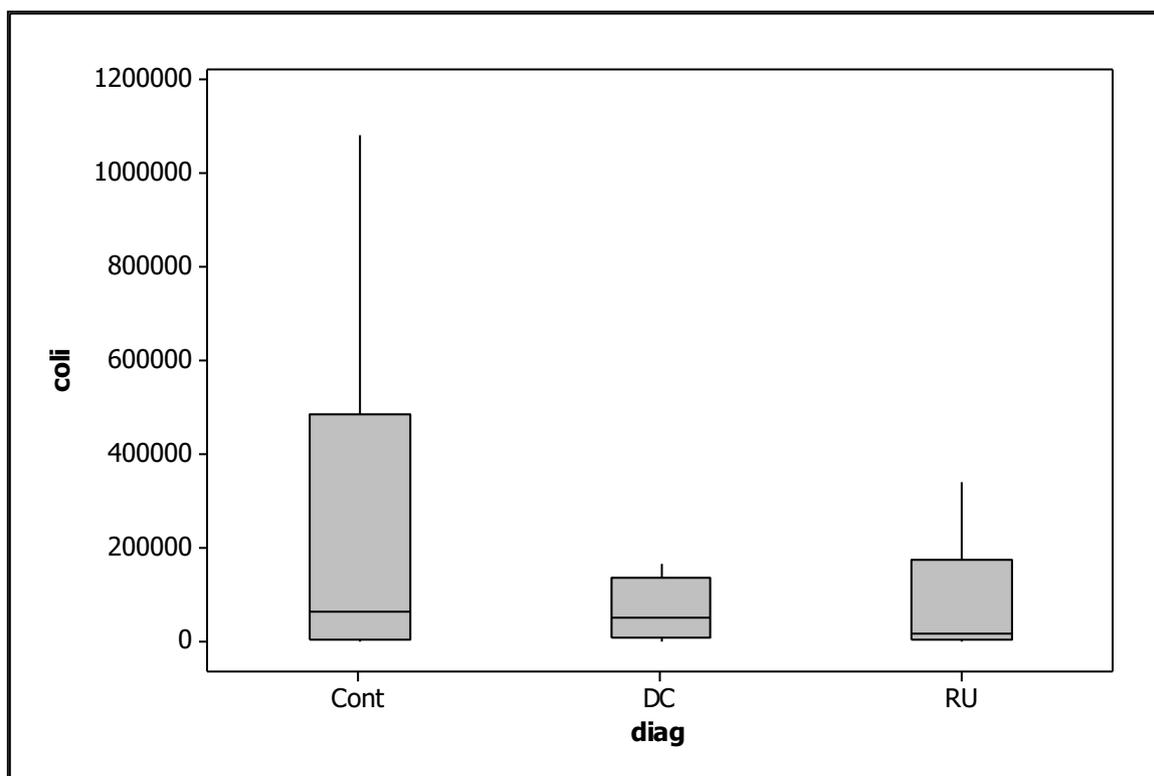
Como as variáveis não apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação dos tipos de diagnóstico.

Para o estudo da correlação entre a *E. Coli* e a porcentagem de aderência foi utilizado o coeficiente de correlação de Spermann.

Tabela 3- Mediana, 1^o e 3^o quartil, referentes à quantidade de *E. Coli*, segundo diagnósticos.

Diagnóstico	N	Mediana	1 ^o quartil	3 ^o quartil
RU	14	15750,0	6230,9	147643,6
DC	23	52682,9	10447,6	126562,5
Cont	16	65172,4	6501,1	404929,7

Gráfico 1- Box plot referente à *E. Coli* segundo diagnóstico($p=0,78$)



*Quantidade de bactérias *E. Coli* por amostra

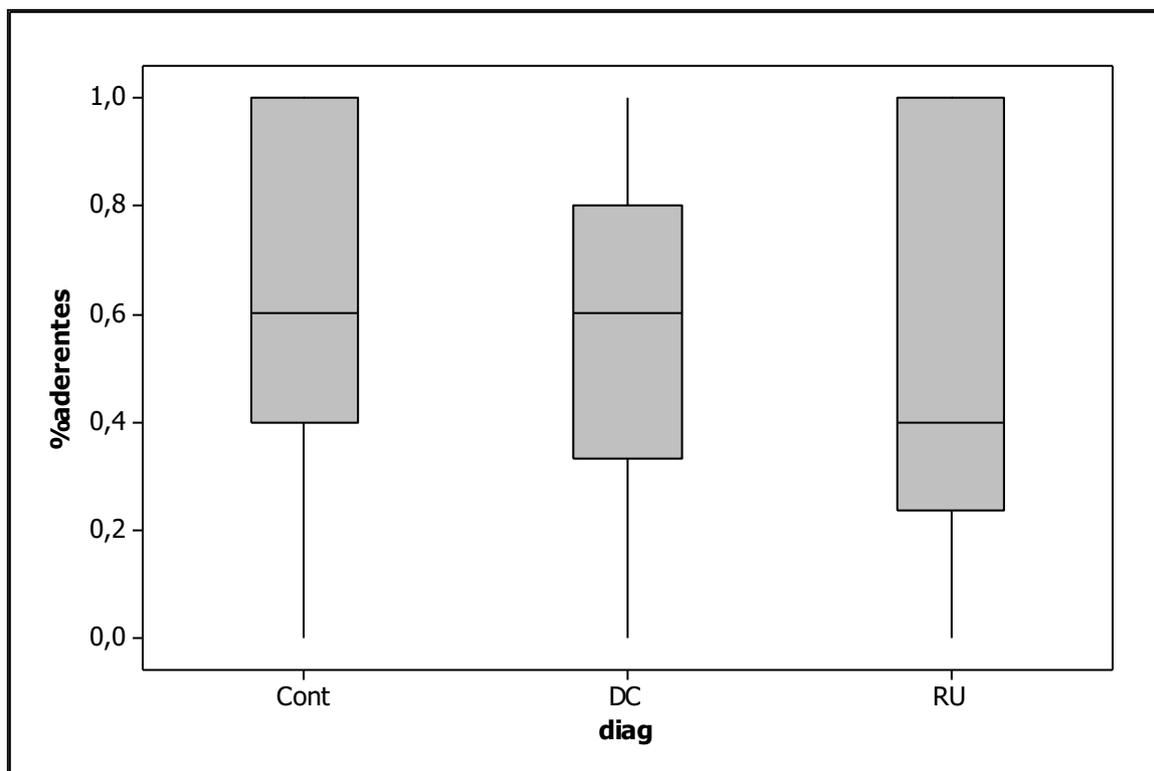
**Cont: Controle; DC: Doença de Crohn; RU: Retocolite Ulcerativa.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tipos de diagnósticos.

Tabela 4- Mediana, 1^o e 3^o quartil, referentes à % de aderência, segundo diagnósticos.

Diagnóstico	N	Mediana	1 ^o quartil	3 ^o quartil
RU	14	40,0	25,0	100,0
DC	23	60,0	35,0	80,0
Cont	16	60,0	40,0	100,0

Gráfico 2 – Box plot referente à % de aderentes segundo diagnóstico ($p=0,15$)

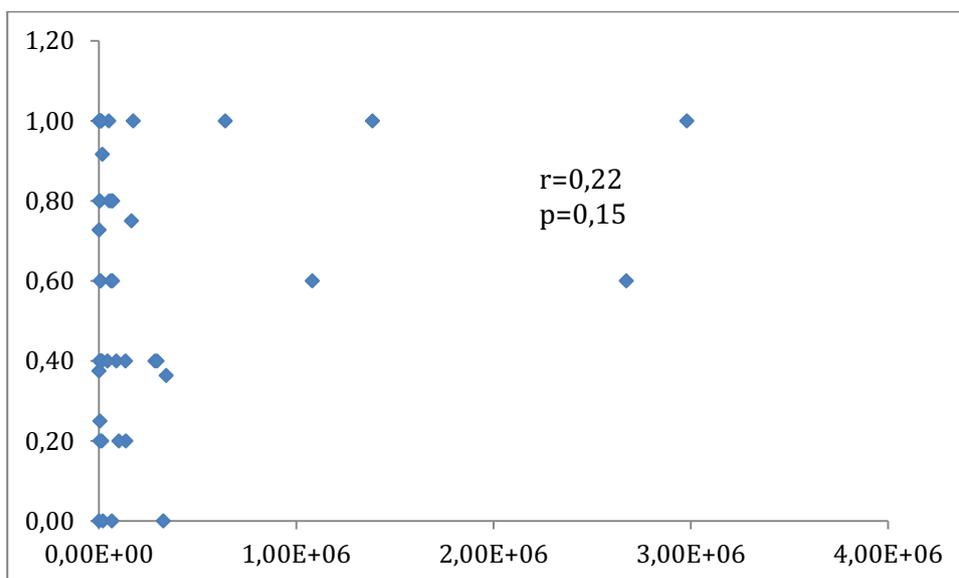


*Porcentagem de colônias de *E. Coli* aderentes por amostra.

**Cont: Controle; DC: Doença de Crohn; RU: Retocolite Ulcerativa

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tipos de diagnósticos.

Gráfico 3- Diagrama de dispersão entre a quantidade de bactérias *E. Coli* e à porcentagem de aderência das amostras.



Não houve correlação entre as variáveis.

5. Discussão

A DII apresenta sintomas de uma infecção normal. Porém, tem muitos fatores envolvidos e um número crescente de evidências tem assinalado a importância da microbiota intestinal (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002). O intestino compreende o nicho mais diversificado e complexo do corpo humano e a grande maioria dos microrganismos a ele associados ainda não é conhecida (RHODES, 2007). Isto se deve em parte a impossibilidade de cultivá-los em condições artificiais. As *E. coli* se tornaram um dos primeiros organismos da microbiota a ter seu envolvimento com a DII investigado, pois é muito abundante e facilmente cultivada.

Em portadores da doença foi constatado um aumento na população destas bactérias (KOTLOWSKI, et al., 2007). Porém, como a *E. coli* está presente em grande quantidade na flora intestinal e possui muitas variedades, é difícil afirmar se essas *E. coli* excedentes são frutos da multiplicação das nativas, devido à um desequilíbrio no sistema imune, ou se são exemplares de uma cepa patogênica (SAMEGIMA, 2008).

Apesar de o potencial de patogenicidade da *E. coli* na DII ainda não ser totalmente conhecido, as propriedades de adesão a células epiteliais, em experimentos realizados *in vitro*, tem sido comumente estudadas. Resultados sobre adesão a células epiteliais tem sido conflitantes entre vários pesquisadores. Porém observou-se que é importante levar em conta fatores como a linhagem de células utilizadas (MARTIN, et al., 2004.) e o tempo de incubação dessas bactérias com as células hospedeiras (SASAKI, et al., 2007).

Estudos mostram que testes com células HEp-2, originárias de carcinoma de laringe, em testes de 6 horas, não mostram diferenças na prevalência de adesão entre os portadores da DII e o grupo controle (SCHULTSZ, et al., 1997.). Porém em outro estudo quando o tempo de incubação é reduzido para 3 horas, foi observado um predomínio de linhagens aderentes em pacientes com DII (SAMEGIMA, 2008). Nesse estudo também foi mostrado que as amostras aderentes dos testes de 6 horas são geneticamente diferentes das amostras aderentes dos testes de 3 horas. Assim, mostrando a importância de

realizar apenas 3 horas de incubação nos testes de adesão com amostras isoladas de pacientes com DII (SAMEGIMA, 2008).

No presente estudo, porém, não observamos uma diferença estatisticamente significativa na prevalência de amostras positivas para o teste de aderência entre pacientes com RU, DC e o grupo controle utilizando o teste de adesão com incubação por 3 horas. Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de bactérias por amostra quanto ao diagnóstico DC, RU e o grupo controle. Não foi observado relação entre a prevalência de amostras positivas para o teste de adesão com incubação de 3 horas e a quantidade de bactérias por amostras e, por último, não foi observado relação entre o perfil bioquímico das amostras e os diagnósticos.

Acredita-se que a proliferação de *E. coli* na mucosa é favorecida pela abundância de muco, presente na DII pela alteração da fisiologia intestinal (NAZLI; et al., 2004.). Sendo assim as linhagens patogênicas estariam presentes no muco e não no lúmen intestinal (RHODES, 2007.).

Ainda não é possível determinar se o aumento no número de *E. coli* na flora intestinal de pacientes de DII está envolvido na causa da doença ou se é apenas uma consequência, mas sua importância no desenvolvimento da doença é cada vez mais evidente. Também está sendo muito estudado as características típicas das linhagens de *E. coli* encontradas em pacientes, entre elas a capacidade de adesão. Porém a capacidade de adesão às células eucarióticas é uma característica comumente encontrada nessas bactérias, e ainda não foi possível estabelecer uma relação com sua patogenicidade.

6. Conclusão

O resultado desse estudo vai contra o esperado, devido as informações encontradas na literatura, o que torna o resultado não conclusivo e justifica outros estudos mais aprofundados sobre o tema, com um maior número de amostras e utilizando uma metodologia com mais padronização no delineamento.

7. Referências

ANDUS, T.; GROSS, V. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease - Environmental factors. **Hepato-Gastroenterol.**, v. 47, p. 29-43, 2000.

BARNICH, N.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, v.13, p. 5571-5576, 2007.

BURKE, D. A.; AXON, A. T. R. Adhesive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea, **BMj.**, v. 297, 1988.

COOKE, E. M.; EWINS, S. P.; HYWEL-JONES, J.; LENNARD-JONES, J. E. Properties of strains of *Escherichia coli* carried in different phases of ulcerative colitis. **Gut.**, v. 21, p. 143-146, 1974.

DICHI, I. et. al. Use of proteic metabolism (¹⁵N-glycine) in the early detection of disease exacerbation in patients with non-specific ulcerative colitis. **Arq.Gastroenterol.** Jul-Sep; v. 35(3), p. 175-80, 1998.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology.**, v. 115, p. 182-205, 1998.

FIOCCHI, C. The multiple components of inflammatory bowel disease pathogenesis: should we invest in all of them or should we pick and choose? **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 399-400, 2005.

GEDIIB (Grupo de Estudos da Doença Inflamatória Intestinal do Brasil) –
www.gediib.org.br

GIONCHETTI, P.; RIZZELLO, F.; CAMPIERI, M. Probiotics and antibiotics in inflammatory bowel disease. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 17, p. 331-335, 2001

GUARNER, F. C. The intestinal flora in inflammatory bowel disease: normal or abnormal. **Curr. Opin. Gasastroenterol.**, v. 21, p. 414-418, 2005.

HENDRICKSON, B. A.; GOKHALE, R.; CHO, J. H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 79-94, 2002.

HOOVER, L. V. Bacterial contributions to mammalian gut development. **TRENDS Microbiol.**, v. 12, p. 129-134, 2004.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Ver.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KOTLOWSKI, R. et al. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 56, p. 669-675, 2007.

MARTIN, H. M. et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. **Gastroenterology**. v. 127, p.:80-93, 2004.

MASSERET, E.; BOUDEAU, J.; COLOMBEL, J. F.; NEUT, C.; DESREUMAUX, P.; JOLY, B.; CORTOT, A.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease. **Gut.**, v. 48, p. 320-325, 2001.

Murray, Patrick R. **Microbiologia Médica. 4ª ed.**, Elsevier, 2004.

Murray, Patrick R. **Microbiologia Médica. 6ª ed.**, Elsevier, 2009.

MYLONAKI, M.; RAYMENT, N. B.; RAMPTON, D. S.; HUDSPIETH, B. N.; BROSTOFF, J. Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.11, p. 481-487, 2005.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11(1), p. 142-201, 1998.

NAZLI, A.; et al. Epithelia under metabolic stress perceive commensal bacteria as a threat. **Am. J. Pathol.**, v. 164, p. 947-957, 2004.

NOVERR, M. C.; HUFFNAGLE, G. B. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? **TRENDS Microbiol.**, v. 12, p. 562-567, 2004.

RHODES, J. M. The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 56, p. 610-612, 2007.

SAMEGIMA, D. A. G. Algumas propriedades de virulência de *Escherichia coli* isoladas de pacientes com doença inflamatória intestinal. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)** – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

SASAKI, M. et al. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. **Labor. Invest.**, v. 10, p. 1-13, 2007.

SCHULTSZ, C. et al. Frequency of pathogenic and enteroadherent *Escherichia coli* in patients with inflammatory bowel disease and controls. **J. Clin. Pathol.**, v. 50, p. 573-579, 1997.

SEKSIK, P. et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. **Gut**, v. 52, p.237-242, 2003.

SOUZA, H. L.; CARVALHO, V. R.; ROMEIRO, F. G.; SASSAKI, L. Y.; KELLER, R.; RODRIGUES, J.; Mucosa-associated but not luminal *Escherichia coli* is augmented in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Gut**, 2012.

STROBER, W.; FUSS, I.; MANNON, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **J. Clin. Invest.**, v. 17, p. 514-521, 2007.

THOMAZINI, C. M.; SAMEGIMA, D. A. G.; RODRIGUES, M. A. M.; VICTORIA, C. R.; RODRIGUES, J. High prevalence of aggregative adherent *Escherichia coli* strains in the

mucosa-associated microbiota of patients with inflammatory bowel diseases.

International Journal of Medical Microbiology., v. 301, p. 475-479, 2011.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R.: EPM – Modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização do teste de produção de gás a partir de glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. **Re. Microbiol.**, São Paulo 1982, 12:309-315.

Trabulsi, Luiz B.; Alterthum, Flávio **Microbiologia. 5^a ed.**, Atheneu Editora, 2008.

WHELAN, G. **Clinicas Médicas da América do Norte**. Rio de Janeiro: R. G. Farmer, 1990.
Cap. 1, p. 1-13. Epidemiologia da doença inflamatória intestinal.