

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

**CONFECÇÃO E SELEÇÃO *IN VITRO* DE MUTANTES COM VIRULÊNCIA
ATENUADA DE CEPA APEC POR MUTAGÊNESE MARCADA COM
ASSINATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso

DANIEL BRISOTTO PAVANELO

Orientadora: Fabiana Horn

Co-orientadora: Letícia Beatriz Matter

Porto Alegre, 2010.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Celular, situado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Dedico este trabalho à minha família e aos meus amigos, as pessoas mais importantes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha irmã, por tudo, sempre;

A Daniel, Leonardo, Lucas, Pedro e Rafael, pelo apoio e por entenderem minha frequente ausência;

Ao Rodrigo, por toda a importância na reta final;

A Andressa, Carla, Cícero, Gabriel, Káren e Susana, pela amizade ao longo do curso e, dependendo de mim, ao longo da vida;

À Marina, por tudo o que passamos e pela amizade que construímos;

À Mariane, pelo apoio e companheirismo desde o dia da matrícula, e pela cobrança no último semestre;

À Ana Paula, pela convivência e cobrança no último semestre;

Aos meus tios, primos, à minha avó e ao meu afilhado, por serem um abrigo em tempos difíceis e também por entenderem a minha ausência;

Às minhas colegas de Laboratório, Aline, Naíta, Nicolle e Roberta, pela ajuda, pela compreensão e pela amizade;

Às meninas que passaram rapidamente pelo Laboratório, mas que foram fundamentais no início do meu trabalho, Alessandra, Bruna e Taís;

Ao pessoal da Policlínica Militar de Porto Alegre, que também ajudou nessa reta final;

À minha cachorrinha, Yoko, que me recebeu sempre feliz durante todos os dias da faculdade;

À minha co-orientadora, Letícia Matter, pelos ensinamentos, pelas habilidades de bancada que me passou, pelo companheirismo durante as férias e pelo projeto deste trabalho;

À minha orientadora, Fabiana Horn, pela oportunidade de fazer parte desse grupo, pela paciência com as minhas fases difíceis, pela tolerância, pela ajuda ao longo de todo o curso e pelos ensinamentos.

ÍNDICE

RESUMO	5
1. INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	6
1.1. <i>E. coli</i> patogênicas.....	6
1.2. <i>E. coli</i> patogênicas aviárias	7
1.3. Fatores de virulência de APEC.....	8
1.3.1. Adesinas	8
1.3.1.1. Adesinas fimbriais.....	8
1.3.1.2. Adesinas afimbriais.....	9
1.3.2. Invasinas	10
1.3.3. Fatores de resistência ao soro	11
1.3.4. Fatores de aquisição de ferro.....	12
1.3.5. Toxinas.....	13
1.3.6. Outros fatores.....	14
1.4. A cepa APEC MT 78.....	14
1.5. A técnica de mutagênese marcada com assinatura	15
1.6. Objetivos.....	17
2. ARTIGO CIENTÍFICO	18
3. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	41
4. REFERÊNCIAS ADICIONAIS	43

RESUMO

A *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) é o principal agente da colibacilose aviária. Ainda não há um patotipo estabelecido para APEC, mas diversos genes associados à virulência já foram descritos para essa bactéria. Dentre as diversas cepas estudadas de APEC, destaca-se a MT 78, que possui 20 de 33 fatores associados à virulência testados, causa morte celular em macrófagos aviários e é capaz de invadir células não-fagocitárias (fibroblastos aviários de linhagem). Para investigar qual gene da MT 78 é essencial para que a cepa invada células não-fagocitárias, foi construída uma biblioteca de 1800 mutantes dessa cepa, através da técnica de mutagênese marcada com assinatura (STM). Foram feitos ensaios de invasão com metade dos mutantes (900); a outra metade também será testada. Os ensaios consistem na infecção de fibroblastos aviários de linhagem e recuperação das bactérias intracelulares após 4 horas; o DNA dos mutantes será extraído e será possível detectar quais os mutantes presentes na infecção e ausentes na recuperação dos experimentos. Esses mutantes serão investigados devido à perda da capacidade de invasão. Será possível descobrir qual(is) o(s) gene(s) que sofreu(ram) mutação, e fazer ensaios moleculares com os mutantes atenuados. Os principais resultados desse trabalho, até o momento, são a construção da biblioteca de mutantes e a padronização da técnica de STM *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1. *E. coli* patogênicas

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Foi descrita pela primeira vez em 1855, por Theodor von Escherich, possui formato de bacilo, é um organismo anaeróbico facultativo e é comensal do homem e de outros animais.

A maioria das cepas de *E. coli* não é patogênica, mas há um versátil subgrupo causador de infecções responsável por mortalidade e alto custo para os sistemas de saúde (32, 37). Esses clones são altamente adaptados e adquiriram atributos de virulência específicos que lhes conferiram habilidade de se adaptar a novos nichos e colonizar novos hospedeiros (32). Esses fatores podem ser encontrados em elementos genéticos, podendo estar presentes em diferentes combinações, como plasmídeos, transposons, ilhas de patogenicidade e bacteriófagos (32). Para que um patógeno cause doença em um indivíduo saudável, é necessário que [1] adapta-se e colonize o hospedeiro; [2] sobreviva no seu interior e se multiplique; [3] evada do seu sistema imunológico e [4] dissemine-se a outros hospedeiros (20). Isso é possível graças aos fatores associados à virulência, que permitem à bactéria desenvolver todos esses passos.

É possível dividir as *E. coli* patogênicas em dois grandes grupos, as patogênicas intestinais (InPEC, de Intestinal Pathogenic *E. coli*) e as patogênicas extraintestinais (ExPEC, de Extraintestinal Pathogenic *E. coli*). As InPEC são responsáveis pelas diarreias e podem apresentar diversas estratégias para invadir as células intestinais (37, 51). As ExPEC, por sua vez, são classificadas em três subgrupos: as causadoras de infecção do

trato urinário (UPEC, de UroPathogenic *E. coli*); as causadoras de meningite no neonato (NMEC, de Newborn Meningitis-causing *E. coli*); e as que causam colibacilose em aves (APEC, de Avian Pathogenic *E. coli*). (32).

1.2. *E. coli* patogênicas aviárias

A infecção de aves por *E. coli* foi descrita pela primeira vez em 1894, por Lignieres e, em 1954 e 1955, Wassermann *et al.* e Fahey, respectivamente, isolaram *E. coli* dos sacos aéreos de aves com doença respiratória (38). Trata-se da colibacilose, a infecção mais comum em aves, que se pode manifestar de várias formas, como peritonite do ovo, onfalite, síndrome da cabeça inchada, celulite e colissepticemia, essa última sua manifestação mais grave (38). A colissepticemia afeta galinhas, perus e patos de 4 a 12 semanas, e é caracterizada por pericardite, peri-hepatite, aerossaculite, sinovite, peritonite, conjuntivite e enterite (2, 10, 38). Aves selvagens, domésticas e ornamentais podem ser afetadas, normalmente após uma prévia infecção bacteriana (por *Mycoplasma sp.*) ou viral (pelo Virus da doença de Newcastle ou da bronquite infecciosa, por exemplo) (7, 38). Pelo fato dessa doença causar prejuízos significativos na avicultura em todo o mundo (17), vários grupos de pesquisa vêm investigando as bases moleculares da colibacilose aviária, bem como a interação patógeno-hospedeiro entre as aves e as cepas APEC e os perfis patogênicos, fenotípicos e genotípicos dessas bactérias.

As cepas de *E. coli* podem ser classificadas de diversas formas, uma delas é a determinação do sorogrupo. Para isso, é utilizada a identificação de antígenos somáticos (O, *Öhne*, LPS), capsulares (K, *Kapsel*), flagelares (H, *Hauch*) e fimbriais (F, *Fimbriae*), todos eles presentes na superfície

bacteriana. Algumas cepas não podem ser sorotipadas, devido à perda parcial ou total da cadeia lipopolissacarídica (21). Entre as APEC, os sorotipos mais comuns no hemisfério Norte são O1, O2, O8, O35 e O78 (38), sendo O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119 e O152 os mais freqüentes no Brasil (21).

Embora existam sorotipos mais associados às cepas APEC virulentas, não existe, até o momento, nenhum marcador do patotipo de APEC (17). Entretanto, há uma série de fatores de virulência descritos para APEC. Entre eles, incluem-se adesinas, invasinas, fatores de resistência ao soro, sistemas de aquisição de ferro, toxinas, entre outros (6). Alguns desses fatores serão discutidos a seguir.

1.3. Fatores de virulência de APEC

1.3.1. Adesinas

Conforme descrito por Gross (25), o pulmão e os sacos aéreos seriam as principais portas de entrada de patógenos em aves, e o trato gastrointestinal é um reservatório de cepas patogênicas e não-patogênicas de *E. coli*, devido ao comensalismo dessa bactéria com aves (18). A expressão de adesinas é uma forma de facilitar a passagem da bactéria do intestino para a corrente sanguínea, bem como a colonização dos pulmões da ave (61).

1.3.1.1. Adesinas fimbriais

As adesinas mais estudadas e mais bem caracterizadas são as adesinas fimbriais. As fímbrias são filamentos de proteínas ou apêndices expressos na superfície celular das bactérias, de 1 µm de comprimento e 7 nm de largura, formadas por cerca de 1000 subunidades (37), e podem ser

de diferentes tipos (17). A fímbria mais comum em APEC é a fímbria do tipo 1 (*fim*), cuja maior subunidade é a proteína FimA; é codificada por um operon de 9 genes (37), e está presente em mais de 70% das cepas APEC (4, 6, 13, 19). Na sua extremidade mais externa, encontra-se a proteína FimH, responsável pelo reconhecimento de moléculas de manose, que promove a aderência da bactéria às superfícies mucosas (5). Outra fímbria importante para APEC é a fímbria P, codificada pelo operon *pap*. Em humanos, a fímbria P está associada à pielonefrite (54), e em aves à colonização dos órgãos internos depois do estabelecimento da infecção inicial (38, 48). A fímbria F1C é uma estrutura semelhante à fímbria do tipo 1; é codificada pelo operon *foc*, e sua maior subunidade é a proteína FocA (37). A fímbria S é outra estrutura encontrada em APEC, embora esteja mais associada a NMEC (4). É codificada pelo operon *sfa*, e pode ser associada à fímbria F1C no operon *sfa/foc*. Outra fímbria bastante presente em APEC é Curli (6, 19), uma estrutura fina e enrolada. É codificada pelo operon *csg*, e sua maior subunidade é a proteína CsgA (37).

1.3.1.2. Adesinas afimbriais

A adesina afimbriada Tsh (temperature-sensitive haemagglutinin), da família dos autotransportadores secretados por bactérias Gram-negativas (58), é importante para APEC por contribuir para os primeiros passos da infecção, incluindo a colonização dos sacos aéreos (16). Além disso, a Tsh é responsável pela aglutinação de hemácias em temperaturas inferiores a 26° C (50). Outra adesina afimbriada é *afa*, codificada pelo cluster gênico *afa-8*, uma das adesinas afimbriais mais frequentes em *E. coli* patogênicas humanas, e está associada a cepas APEC *pap*-negativas (17, 61). Essa

adesina contribui para a virulência a pintos de 1 dia, e para a indução de colibacilose clássica da mesma maneira que as cepas *pap*-positivas (60).

1.3.2. Invasinas

A invasão às células do hospedeiro permite que a bactéria se multiplique intracelularmente, bem como permaneça de maneira quiescente (20). Ainda não é claro o processo pelo qual APEC chega à circulação sanguínea (17), mas experimentos *in vitro* e *in vivo* mostram que cepas APEC são capazes de sobreviver à ação de macrófagos (43, 48) e experimentos *in vitro* demonstram que pelo menos uma cepa APEC é capaz de invadir fibroblastos aviários (40).

Entre os fatores de virulência que auxiliariam o processo de invasão de APEC a células de seu hospedeiro estão a proteína IbeA e o homólogo da proteína Tia, bem como a ilha de patogenicidade *gimB*. A proteína IbeA foi descrita em NMEC e sua função é auxiliar na invasão da barreira hematoencefálica (34). Em APEC a frequência desse gene é baixa (6, 19), e sua provável função é auxiliar a colonização do epitélio pulmonar (11, 24, 44). A proteína Tia foi descrita na *E. coli* enterotoxigênica, desempenhando papel de aderência e invasão de células humanas íleo-cecais e epiteliais colônicas em cultura (23). Em APEC, a proteína homóloga à Tia é codificada pelo gene *tia*, localizado em uma ilha de patogenicidade de 56 kb, a mesma que codifica o operon *pap* e outros fatores de virulência (33). A ilha de patogenicidade *gimB*, que é característica de NMEC, está associada à manutenção dos níveis de bacteremia característicos da meningite (9). A frequência de *gimB* em APEC é baixa, cerca de 10% (6, 19).

1.3.3. Fatores de resistência ao soro

APEC têm sua virulência aumentada devido a fatores que oferecem resistência à ação do sistema complemento e à fagocitose mediada por opsonização (46). O plasmídeo colV é importante para a resistência ao soro, pois codifica o gene da colicina V - uma proteína importante na infecção de pintos de 1 dia (65) -, *traT* e *iss*, que supostamente protegem a membrana bacteriana do ataque do sistema complemento (17). Acredita-se que a proteína TraT antagoniza a deposição de C3 (1) e inibe a formação do complexo C5b6 (49). A proteína Iss desempenha um papel importante na resistência de APEC ao soro (42), e sua presença é necessária para a virulência como um todo (62).

Outro fator de virulência bastante prevalente em cepas ExPEC que também é encontrada em APEC é a cápsula K1 (38). A cápsula K1 é um polissacarídeo que contém ácido polissialílico e está associado a infecções extra-intestinais (8). Além disso, esse fator de virulência possui propriedade anti-fagocítica (63), pode estar envolvido na resistência ao soro (59) e é essencial para a penetração da barreira hemato-encefálica (35). Tamanha é a importância da cápsula K1 que a sua presença é necessária para classificar uma cepa *E. coli* em NMEC (36). A proteína OmpA, presente na maioria das cepas APEC (6), faz parte da membrana externa de *E. coli* e outras enterobactérias. Desempenha função de adesina, invasina e serve, ao mesmo tempo, como alvo do sistema imunológico do hospedeiro e como fator de resistência ao soro. OmpA também é sítio de reconhecimento de vários bacteriófagos (56).

1.3.4. Fatores de aquisição de ferro

A habilidade de sequestrar ferro dos tecidos corporais desempenhada pelas bactérias patogênicas é essencial para sua virulência, pois o ferro é utilizado na cadeia respiratória e está em baixas concentrações nos tecidos do hospedeiro. Em APEC, essa característica está associada à letalidade de pintos de 1 dia (14). Entre os sistemas sideróforos, o sistema da aerobactina é o mais bem caracterizado e foi descrito em uma ilha de patogenicidade de *Shigella* (64). Um trabalho recente mostrou que o sistema da aerobactina é codificado também em uma região conservada de virulência de um plasmídeo do tipo ColV, pAPEC-O2-ColV (31). O sistema da aerobactina é composto pelo operon *iucABCD* e pelo gene *iut*, que codificam um sideróforo hidroxamato e o receptor férrico da aerobactina (17, 38). A transformação de uma *E. coli* comensal com o plasmídeo contendo o sistema da aerobactina aumentou a letalidade da cepa para embriões aviários e a capacidade de colonização renal em camundongos (55), demonstrando a importância desse sistema à virulência. Outro fator de aquisição de ferro, também encontrado em plasmídeos do tipo ColV, é a salmoquelina, codificada pelo operon *iroBCDEN*. Uma das proteínas desse sistema, IroN, tem a sua expressão regulada de acordo com a presença de ferro no meio (57). Outro fator sideróforo é o sistema transportador de ferro, codificado pelo operon *sitABCD*. O sistema é composto por permeases, que aumentam a captura de ferro e manganês, contribuindo com a multiplicação bacteriana. Juntamente com a proteína MntH, medeia a resistência ao estresse oxidativo (53). Outros fatores sideróforos, como *fyuA* e *irp2*, foram primeiramente descritos em *Yersinia enterocolitica*, mas também são encontrados em InPEC e APEC (38). O gene *ireA* é outro fator associado à captação de

ferro, foi descrito em cepa UPEC, e contribui para aumentar a invasão em bexiga de camundongos (52). O gene *chuA*, receptor e utilizador de ferro heme em *E. coli*, foi descrito para APEC em experimento por STM *in vivo* (39), sugerindo seu papel na virulência.

1.3.5. Toxinas

Bactérias patogênicas são capazes de produzir substâncias que, *per se*, são tóxicas ao hospedeiro. Entre as toxinas mais produzidas por APEC está a proteína Vat (6, 19), codificada pelo gene *vat* em uma ilha de patogenicidade. Essa toxina causa vacúolos na célula do hospedeiro, levando a um efeito citotóxico semelhante ao observado pela toxina VacA, de *Helicobacter pylori* (47). Há também toxinas pouco encontradas em APEC (em torno de 1%) (6, 19), como a α -hemolisina, codificada pelo gene *hlyA*, que causa hemólise no hospedeiro. Hemolisinas são produzidas por diversas bactérias patogênicas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Em APEC, a α -hemolisina é secretada por um sistema de secreção do tipo I (22, 45). O fator de citotoxicidade necrosante, codificado pelo gene *Cnf1/2* (12), e a serino-protease codificada pelo gene *sat* (26), também são pouco encontradas em APEC. Ensaio de cepas contendo esses genes mostraram citotoxicidade para células VERO.

1.3.6. Outros fatores de virulência

Além dos fatores anteriormente descritos, existem diversos outros, entre esses alguns ainda sem classificação, como o gene *pic*, que possui atividade serino-protease (27), e a ilha de patogenicidade *malX* que, além de ser um marcador de virulência, contribui na patogenicidade de APEC (30).

1.4. A cepa APEC MT 78

Entre as diversas cepas APEC estudadas, uma bastante virulenta e bem caracterizada é a cepa MT 78, isolada na França, em 1982 (15), da traqueia de uma galinha com colibacilose associada à infecção com *Mycoplasma sp.* Essa cepa vem sendo estudada pelo nosso grupo há algum tempo e mostrou-se virulenta em ensaios com macrófagos aviários, causando morte celular por apoptose (29).

Em outro estudo do nosso grupo, no qual várias cepas virulentas foram testadas em ensaios de invasão a fibroblastos aviários de linhagem (CEC-32), a cepa MT 78 foi a única que se mostrou invasiva, superando o controle positivo *Salmonella typhimurium* SL1344 (40). Também nesse estudo as cepas foram testadas para 33 genes associados à virulência, e a MT 78 apresenta 20 deles, pelo menos um de cada uma das categorias anteriormente descritas (exceto toxinas) (40):

- Adesinas: *crl*, *fimC* e *hrlA/hek*;
- Invasinas: *gimB* e *ibeA*;
- Sistemas de aquisição de ferro: *chuA*, *fyuA*, *ireA*, *iroN*, *irp2*, *iucD*, *sitD chr* e *sitD ep*;
- Fatores de resistência ao soro: *iss*, *neuC*, *kpsMT II*, *ompA* e *traT*;
- Outros: *cvi/cva* e *Rpai*.

O fato de essa cepa ser invasiva e possuir tantos fatores de virulência nos faz perguntar qual desses genes, se algum deles em especial, é essencial para que a cepa seja capaz de invadir as células CEC-32. Além disso, a cepa MT 78 surge como um potencial modelo para estudos de genômica em APEC, uma vez que possui diversos genes associados à virulência.

1.5. A técnica de Mutagênese Marcada com Assinatura (STM)

Uma das técnicas mais atrativas para estudos genômicos de microrganismos é a Mutagênese Marcada com Assinatura (STM, do inglês **S**ignature **T**agged **M**utagenesis) (41). A técnica de STM foi descrita em 1995, por Hensel *et al.* (28), quando 1152 mutantes de *S. typhimurium*, carregando sequências únicas de DNA (*tags*), foram divididos em 12 *pools* (conjuntos) e inoculados em camundongos. Quarenta desses mutantes não foram recuperados após a inoculação dos camundongos. A região flanqueadora das *tags* inseridas em 28 desses 40 mutantes foi sequenciada. Foram encontrados genes já descritos para *S. typhimurium*, genes descritos para *E. coli*, sequências similares a genes descritos para bactérias e sequências desconhecidas (28). Esse estudo foi muito importante porque desenvolveu uma técnica que permitiu a identificação simultânea de genes de virulência utilizando poucos animais.

Para APEC, foram desenvolvidos pelo menos dois trabalhos com essa técnica. Um deles permitiu a detecção dos genes *chuA* e *sitB* (sistemas de captação de ferro) na cepa APEC IMT 5155 (39), e o outro detectou a adesina fimbrial Yqi (ExPEC Adesina I) nessa mesma cepa (3). Em cada um desses estudos foi confeccionada uma biblioteca de 1800 mutantes, divididos em *pools*, que foram infectados em galinhas. Aqueles mutantes que não foram recuperados após a inoculação tiveram a sequência flanqueadora de sua *tag* sequenciada.

A técnica de STM consiste na construção de uma biblioteca de mutantes com uma assinatura molecular (*tag*), que é uma sequência de DNA inserida no genoma da bactéria através de algum vetor, que pode ser um

plasmídeo carregando um transposon. É gerada, assim, uma mutagênese não direcionada, pois a *tag* pode inserir-se em qualquer parte do genoma. Os mutantes são divididos em *pools* para que se obtenha maior rendimento das *tags*, já que os *pools* são testados separadamente e, dessa forma, não há problema que haja *tags* iguais em *pools* diferentes. Os mutantes devem passar por alguma forma de seleção (nos estudos citados, infecção de camundongos e galinhas), após o que são recuperados. O DNA dos mutantes é extraído e as *tags* são amplificadas por PCR. As *tags* são amplificadas mais uma vez com marcação (radiação ou fluorescência). Esse procedimento é feito com o *pool* de bactérias que é inoculado e com o *pool* que é recuperado após a infecção. O objetivo da técnica é detectar quais os mutantes que estão presentes no *pool* de infecção e ausentes no *pool* de recuperação, e essa identificação é feita através da comparação das *tags* amplificadas. Para isso, é feita uma hibridização DNA-DNA (*dot blot*) com cada *pool* (infecção e recuperação) e os sinais da hibridização são comparados. Aquelas *tags* que emitiram sinal no *pool* de infecção, mas não emitiram no *pool* de recuperação, devem estar inseridas em algum gene importante para a virulência, pois o mutante não colonizou o hospedeiro no ensaio de seleção. As sequências que flanqueiam a *tag* são, então, determinadas por sequenciamento. São utilizados bancos de dados para comparar as sequências encontradas com as já existentes, assim é possível descobrir a função do gene interrompido pela *tag*, se esse gene já foi descrito para outro organismo, se há alguma homologia do gene encontrado com algum outro já descrito, ou se esse gene é completamente novo.

A técnica de STM é promissora por permitir uma triagem (*screening*) aleatória e simultânea de todo o genoma de microrganismos, possibilitando a identificação de genes de virulência e podendo ser aplicada de várias maneiras, seja *in vivo* ou *in vitro*.

1.6. Objetivo

O objetivo geral desse estudo é a construção de uma biblioteca de mutantes da cepa MT 78 e a aplicação da técnica de STM para essa biblioteca através de ensaios de invasão a células aviárias não-fagocitárias (fibroblastos de linhagem CEC-32) *in vitro*.

Os objetivos específicos são [1] confeccionar uma biblioteca de mutantes da cepa MT 78, [2] padronizar a técnica de STM *in vitro* e [3] selecionar mutantes incapazes de invadir células aviárias não-fagocitárias *in vitro* para futuros experimentos *in vivo*.

1 2. ARTIGO CIENTÍFICO

2 Revista para submissão: Infection and Immunity

3

4 Confecção e Seleção *in vitro* de Mutantes de Cepa APEC por STM

5 Daniel Pavanelo¹, Letícia Matter^{1,2} e Fabiana Horn¹

6

7 ¹ Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, POBox 15005, 9500 Av.

8 Bento Gonçalves, 91501-570 Porto Alegre, RS, Brazil

9 ² Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Santo Ângelo, RS, Brazil

10

11 ABSTRACT

12 Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) are the agent of the colibacillosis
13 in poultry. No pathotype has been established for APEC, but there are
14 several genes associated with virulence described for this bacteria. Among a
15 few well-studied APEC strains, MT 78 presents 20 out of 33 tested virulence-
16 associated genes, causes cellular death in avian macrophages and is able to
17 invade non-phagocytic cells (Chicken fibroblast cell line CEC-32). To
18 investigate which gene(s) of MT 78 is(are) essential for the invasion of non-
19 phagocytic cells by this strain, we have built a library with 1,800 mutants of
20 this strain through signature tagged mutagenesis (STM). We did invasion
21 tests with half of the mutants. These tests consist in infecting chicken
22 fibroblasts and recovering intracellular bacteria after four hours. The other
23 half of mutants also will be tested; mutants DNA will be extracted and it will
24 be possible to detect which were not recovered intracellularly. These mutants
25 will be investigated because they have lost the capacity to invade non-
26 phagocytic cells. It will be possible to discover which gene was mutated, and

27 we will do molecular tests with attenuated mutants. The main results of this
28 paper are the production of the mutants library and the standardization of the
29 STM technique *in vitro*.

30 1. INTRODUÇÃO

31 A infecção de aves por *E. coli* foi descrita pela primeira vez em 1894,
32 por Lignieres e, em 1954 e 1955, Wassermann *et al.* e Fahey,
33 respectivamente, isolaram *E. coli* dos sacos aéreos de aves com doença
34 respiratória (13). Trata-se da colibacilose, a infecção mais comum em aves,
35 que pode se manifestar de várias formas, como peritonite do ovo, onfalite,
36 síndrome da cabeça inchada, celulite e colissepticemia, essa última sua
37 manifestação mais grave (13). A colissepticemia afeta galinhas, perus e
38 patos de 4 a 12 semanas, e é caracterizada por pericardite, peri-hepatite,
39 aerossaculite, sinovite, peritonite, conjuntivite e enterite (1, 5, 13). Aves
40 selvagens, domésticas e ornamentais podem ser afetadas, normalmente
41 após uma prévia infecção bacteriana (por *Mycoplasma sp.*) ou viral (pelo
42 Virus da doença de Newcastle ou da bronquite infecciosa, por exemplo) (4,
43 13). Pelo fato dessa doença causar prejuízos significativos na avicultura em
44 todo o mundo (9), vários grupos de pesquisa vem investigando as bases
45 moleculares da colibacilose aviária, bem como a interação patógeno-
46 hospedeiro entre as aves e as cepas APEC e os perfis patogênicos,
47 fenotípicos e genotípicos dessas bactérias.

48 Não existe, até o momento, nenhum marcador do patotipo de APEC
49 (9). Entretanto, há uma série de fatores de virulência descritos para APEC.
50 Entre eles, incluem-se adesinas, invasinas, fatores de resistência ao soro,
51 sistemas de aquisição de ferro, toxinas, entre outros (3).

52 Entre as diversas cepas APEC estudadas, uma bastante virulenta e
53 bem caracterizada é a cepa MT 78, que foi isolada da traqueia de uma
54 galinha com colibacilose, associada à infecção com *Mycoplasma sp.*, na
55 França (8). Estudos mostraram que a cepa apresenta grande capacidade de
56 adesão e invasão em fibroblastos de linhagem (15) e é capaz de ativar o
57 mecanismo de morte celular por apoptose em macrófagos aviários (11).
58 Além disso, apresenta 20 entre 33 genes associados à virulência testados,
59 pelo menos um de cada uma das categorias anteriormente descritas (exceto
60 toxinas) (15).

61 O fato de essa cepa ser invasiva e possuir tantos fatores de virulência
62 nos faz perguntar qual desses genes, se algum deles em especial, é
63 essencial para que a cepa seja capaz de invadir as células CEC-32. Uma
64 das ferramentas que pode ser utilizada para responder a essa pergunta é a
65 técnica de mutagênese marcada com assinatura (STM, do inglês **S**ignature
66 **T**agged **M**utagenesis), descrita por Hensel *et al.* (10).

67 Para APEC, foram desenvolvidos pelo menos dois trabalhos com
68 essa técnica. Um deles permitiu a detecção dos genes *chuA* e *sitB* (sistemas
69 de captação de ferro) na cepa APEC IMT 5155 (14), e o outro detectou a
70 adesina fimbrial Yqi (ExPEC Adesina I) nessa mesma cepa (2). Em cada um
71 desses estudos foi confeccionada uma biblioteca de 1800 mutantes,
72 divididos em *pools*, que foram infectados em galinhas. Aqueles mutantes
73 que não foram recuperados após a inoculação tiveram a sequência
74 flanqueadora de sua *tag* sequenciada.

75 A técnica de STM é tão promissora por permitir uma triagem aleatória
76 e simultânea de todo o genoma de microrganismos, possibilitando a

77 identificação de genes de virulência e podendo ser aplicada de várias
78 maneiras, seja *in vivo* ou *in vitro*.

79 Portanto, o objetivo desse estudo é a construção de uma biblioteca de
80 mutantes da cepa MT 78 e a aplicação da técnica de STM para essa
81 biblioteca através de ensaios de invasão a células aviárias não-fagocitárias
82 (fibroblastos de linhagem CEC-32) *in vitro*.

83 2. CEPAS, PLASMÍDEOS, CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E 84 CONSERVAÇÃO

85 A cepa APEC MT 78 (O2:K1) foi utilizada para a construção de uma
86 biblioteca de mutantes e para os ensaios de invasão. Essa cepa é
87 naturalmente resistente a baixas concentrações (iguais ou menores que 30
88 µg/mL) do antibiótico ácido nalidíxico, e sensível aos antibióticos ampicilina e
89 canamicina.

90 A cepa *E. coli* S17-1 λ pir foi utilizada como aceptora e doadora dos
91 plasmídeos (14). Essa cepa, quando sem plasmídeos, é sensível aos três
92 antibióticos anteriormente mencionados.

93 O plasmídeo utilizado para transformar a cepa *E. coli* S17-1 λ pir foi o
94 vetor pUT associado a transposons do tipo mini-Tn5km2, formando
95 plasmídeos pUTmini-Tn5km2 (Fig. 1). O vetor pUT contém, entre outros, o
96 gene de resistência à ampicilina (7). O transposon mini-Tn5km2 contém o
97 gene de resistência à canamicina (6), além de uma sequência de 80 pares
98 de bases (pb), sendo 40 pb variáveis flanqueadas por 40 pb constantes. As
99 40 pb variáveis são a *tag*, ou seja, a sequência que vai diferenciar cada
100 mutante de um mesmo *pool*; já os 40 pb constantes, divididos em 20 pb
101 *upstream* e 20 pb *downstream*, servem como molde para a amplificação da

102 *tag* (14). Foi utilizado nesse estudo um total de 90 plasmídeos, cada um
103 contendo uma *tag* diferente.

104 O plasmídeo pUTmini-Tn5*km2* é um sistema de entrega que permite a
105 incorporação do transposon Tn5*km2* no genoma da bactéria. Essa
106 incorporação só ocorre, entretanto, na MT78, pois na cepa *E. coli* S17-1 *λpir*
107 o plasmídeo mantém-se viável no citoplasma da bactéria. Portanto, após a
108 transformação da *E. coli* S17-1 *λpir*, essa cepa torna-se resistente aos dois
109 antibióticos cujos genes de resistência estão no plasmídeo (ampicilina e
110 canamicina) (Fig. 2a), ao passo que a MT78, após a conjugação com a *E.*
111 *coli* S17-1 *λpir* transformada, torna-se resistente apenas ao antibiótico cujo
112 gene de resistência está no transposon (canamicina) (Fig. 2b), sendo o teste
113 de susceptibilidade à ampicilina uma forma de detectar a incorporação do
114 transposon ao genoma dessa cepa.

115 O crescimento das bactérias ocorreu em meio Luria-Bertani (LB) caldo
116 ou ágar ou ágar MacConkey, suplementados, quando necessário, de
117 ampicilina (50 µg/mL), canamicina (50 µg/mL) e/ou ácido nalidíxico (30
118 µg/mL), sempre a 37° C. Os estoques dos mutantes da cepa MT 78 foram
119 conservados em caldo LB com canamicina e ácido nalidíxico em 20% de
120 glicerol a -80° C. Os estoques de *E. coli* S17-1 *λpir* transformada foram
121 conservados em caldo LB com canamicina e ampicilina em 20% de glicerol a
122 -80° C.

123 3. CONFECÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

124 Para que seja feita a transformação pelo método de eletroporação, é
125 necessário o uso de células competentes. A partir de pré-inóculo da cepa *E.*
126 *coli* S17-1 *λpir* crescido a 37° C com agitação constante de 160 rev/min

127 *overnight*, 1 mL foi inoculado em 100 mL de caldo LB, e incubado a 37° C
128 sob agitação constante de 180 rev/min até a fase log de crescimento
129 (densidade óptica a 600 nm 0,74). Atingida essa fase, o inóculo foi colocado
130 no gelo por 30 minutos, e após centrifugado a 4000 x g por 15 minutos a 4°
131 C. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi lavado duas vezes com
132 50 mL de glicerol 10% gelado. As células foram ressuspensas em caldo
133 LB, aliquotadas e armazenadas a -80° C.

134 4. ELETROPORAÇÃO

135 Foram realizadas 90 eletroporações para que os diferentes
136 plasmídeos pUTmini-Tn5km2 contendo as 90 tags transformassem a cepa
137 *E. coli* S17-1 λ pir. Para cada eletroporação, foram usados 50 μ L células
138 competentes e 5 μ L de plasmídeo. O pulso foi de 2,5 V, seguido de
139 incubação por 1 minuto em meio LB a 37° C. Após a incubação, 100 μ L das
140 bactérias eletroporadas foram plaqueados em ágar LB com ampicilina (50
141 μ g/mL) e canamicina (50 μ g/mL), e incubados a 37° C durante a noite.

142 5. EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEOS

143 Para confirmar o sucesso das eletroporações, foram feitas extrações
144 de plasmídeos de todas as 90 cepas *E. coli* S17-1 λ pir transformadas,
145 através do método de minipreparação de plasmídeos, descrito em Sambrook
146 e Russell (16). Um volume de 1,5 mL de *E. coli* S17-1 transformada crescida
147 em caldo LB contendo ampicilina (50 μ g/mL) e canamicina (50 μ g/mL) foram
148 centrifugados a 13400 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado, e o
149 sedimento foi ressuspensado em 100 μ L da solução I (glicose 0,9%; Tris
150 0,3% e EDTA 0,37% - m/v). No gelo, 200 μ L da solução II (SDS 1% e NaOH
151 0,2 M - preparada na hora) foram adicionados, e o tubo foi invertido 5 vezes.

152 Depois, foram adicionados 150 μL da solução III (ácido acético glacial 11,5%
153 - v/v - e acetato de potássio 29,5% - m/v), e o tubo foi invertido 5 vezes
154 novamente. A amostra foi mantida no gelo por 5 minutos e centrifugada por
155 5 minutos a 13400 x g. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro
156 tubo, onde foram adicionados 450 μL de clorofórmio, seguido de agitação
157 em vórtex e centrifugação a 13400 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi
158 coletado e transferido para outro tubo, onde o DNA foi precipitado com um
159 mesmo volume de isopropanol, seguido por agitação em vórtex e
160 centrifugação a 13400 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, e
161 o sedimento foi lavado com etanol 70% gelado, seguido de centrifugação a
162 13400 x g por 2 minutos. O sedimento foi seco e ressuspendido em 30 μL de
163 Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) e 1 μL de RNase 20mg/mL. As amostras sofreram
164 eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) submetido a 100 V por cerca de 1
165 hora.

166 A Figura 3 representa um dos géis de agarose com plasmídeos
167 extraídos.

168 6. CONJUGAÇÃO

169 Para transferir os diferentes plasmídeos inseridos nas *E. coli* S17-1
170 λpir para a cepa MT 78 foram realizadas 90 conjugações, uma para cada
171 plasmídeo. Foram testados diversos tempos para o método descrito em (14).
172 Os melhores resultados foram obtidos no tempo de 6 horas. Para a
173 conjugação, 400 μL de inóculo da cepa *E. coli* S17-1 λpir transformada e 400
174 μL de inóculo da cepa MT 78 foram misturados e centrifugados a 13400 x g
175 por 1 minuto. O sedimento foi ressuspendido em 10 μL de solução salina. O
176 homogeneizado de bactérias foi plaqueado no centro de uma placa de ágar

177 LB sem antibióticos. A placa foi incubada a 37° C por 6 horas (com o ágar
178 para baixo). Após a incubação, as colônias foram coletadas, ressuspensas
179 em 100 µL de solução salina e plaqueadas em ágar MacConkey com
180 canamicina (50 µg/mL) e ácido nalidíxico (30 µg/mL). As placas foram
181 incubadas a 37° C durante a noite.

182 7. ORGANIZAÇÃO DA BIBLIOTECA DE MUTANTES

183 Os 90 plasmídeos utilizados são nomeados por uma letra de A a H,
184 seguida de um número, de 1 a 12, da mesma forma que os poços de uma
185 microplaca de 96 poços. Para cada plasmídeo, uma amostra de *E. coli* S17-
186 1 *λpir* foi transformada. A conjugação com MT 78 foi feita com cada *E. coli*
187 S17-1 *λpir* transformada. Do resultado de cada conjugação, 20 colônias
188 foram selecionadas aleatoriamente, totalizando 20 x 90 mutantes. Cada
189 grupo de 90 mutantes, contendo 90 *tags* diferentes, foi armazenado em uma
190 microplaca de 96 poços, formando um *pool*. Foram confeccionados,
191 portanto, 20 *pools* de mutantes, que foram numerados de 1 a 20. As
192 amostras do *pool* 1 são 1A1, 1A2, ..., 1H; as do *pool* 20 são 20A1, 20A2, ...,
193 20H6.

194 8. CULTURA DE FIBROBLASTOS

195 Foi cultivada, *in vitro*, uma linhagem transfectada estável de
196 fibroblastos embrionários aviários, CEC-32 (12), doadas pelo Prof. Bernd
197 Kaspers (Universidade de Munique, Munique, Alemanha), para os ensaios
198 de invasão com os mutantes. Essas células foram usadas como um modelo
199 de células não-fagocitárias (15). As células foram mantidas em estufa úmida,
200 a 37° C com 5% de CO₂, em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium
201 (DMEM) com 10% de soro fetal bovino. O cultivo se deu em garrafas de

202 cultura com superfície de 25 cm² ou 75 cm², de acordo com a quantidade de
203 células. Para os experimentos, foram plaqueadas 2 x 10⁵ células por poço,
204 em placas de 24 poços, para atingir, após dois dias, um total aproximado de
205 5 x 10⁵ células por poço, ideal para os ensaios de invasão (15).

206 9. ENSAIOS DE INVASÃO

207 Foram realizados ensaios de invasão das células CEC-32 com 10 dos
208 20 *pools* de mutantes (*pools* pares). Para cada *pool* os mutantes foram
209 crescidos individualmente, em caldo LB com canamicina (50 µg/mL) e ácido
210 nalidíxico (30 µg/mL), em uma placa de 96 poços durante a noite (14).
211 Depois, o *pool* de mutantes foi misturado e crescido em erlenmeyer, a 37° C
212 sob agitação de 200 rev/min, até o início da fase exponencial (densidade
213 óptica de aproximadamente 0,4 a 600 nm), quando o número de bactérias
214 por mL de inóculo é de aproximadamente 2 x 10⁸. Uma alíquota de 100 µL
215 do inóculo foi plaqueada em ágar LB com canamicina (50 µg/mL) e ácido
216 nalidíxico (30 µg/mL) para a obtenção dos mutantes presentes no *pool* de
217 infecção.

218 Foi feito o cálculo para multiplicidade de infecção (MOI) de 200
219 bactérias por célula. O volume desejado de bactérias foi centrifugado a 4000
220 x g por 10 minutos e o sedimento foi ressuspendido em um determinado
221 volume de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, de modo que cada
222 poço de células fosse infectado com 100 µL da suspensão. As células foram
223 lavadas com tampão fosfato salina (PBS) e infectadas com um total de 500
224 µL de meio, com ou sem bactérias (controles), e incubadas por 1 hora em
225 estufa úmida a 37° C com 5% de CO₂. Após esse tempo, o meio foi
226 removido e as células foram lavadas três vezes com PBS. Foram

227 adicionados 500 μL de meio com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, para matar
228 qualquer bactéria que tenha permanecido extracelular. As células foram
229 incubadas por mais 3 horas e então lisadas com Triton X-100 (Sigma,
230 Streinheim, Alemanha) 1% (v/v) por 5 minutos à temperatura ambiente (15).
231 O lisado foi plaqueado nas concentrações de 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} , em ágar LB
232 com canamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e ácido nalidíxico (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), para a obtenção
233 de amostras dos mutantes capazes de invadir os fibroblastos (*pool* de
234 recuperação).

235 O resultado dos ensaios de invasão foram placas com
236 aproximadamente 10^5 colônias nas concentrações de 10^0 dos *pools* de
237 recuperação, e um n° incontável de colônias nas placas dos *pools* de
238 infecção. Essa quantidade de colônias deve ser suficiente para garantir a
239 presença de ao menos uma colônia representativa de cada um dos mutantes
240 presentes nas amostras.

241 As Figuras 4, 5 e 6 mostram algumas das placas dos ensaios de
242 invasão.

243 10. REAÇÃO DE PCR

244 As 90 *tags* dos plasmídeos foram amplificadas por PCR e utilizadas
245 como sondas na confecção das membranas para a reação de *dot blot*. O
246 DNA molde das reações foram os plasmídeos extraídos das amostras de *E.*
247 *coli* S17-1 λpir transformadas. Foram utilizados os oligonucleotídeos
248 iniciadores P2 5' TACCTACAACCTCAAGCT 3' e P4 5'
249 TACCCATTCTAACCAAGC 3' (14). A reação seguiu as mesmas condições
250 de Antão (2). As amostras foram visualizadas em gel de agarose 2% (m/v)
251 submetido a 40 V por cerca de 2 horas.

252 A Figura 7 mostra um gel de agarose com as *tags* de algumas
253 amostras amplificadas.

254 11. CONFECÇÃO DAS MEMBRANAS PARA *DOT BLOT*

255 Para as reações de *dot blot* que ainda serão realizadas, foram
256 preparadas 6 membranas de *nylon* (GE nylon, Positively Charged Transfer
257 Membrane). O DNA fixado às membranas foram as *tags* amplificadas e
258 desnaturadas (fervura por 10 minutos) dos 90 plasmídeos. O desenho de
259 uma placa de 96 poços foi feito a lápis nas membranas, com divisões de 1
260 cm². Cinco microlitros de cada uma das *tags* amplificadas foram pipetados
261 nos seus espaços correspondentes nas membranas, que foram submetidas
262 à temperatura de 80° C por 2 horas para a fixação do DNA.

263 12. DISCUSSÃO

264 Os principais resultados desse trabalho são a padronização das
265 técnicas para a confecção da biblioteca de mutantes, e a construção da
266 biblioteca em si.

267 Antes de optar definitivamente pelo ácido nalidíxico como antibiótico
268 de seleção na conjugação, foi testada a tetraciclina. A cepa MT 78 é
269 resistente à tetraciclina, enquanto a *E. coli* S17-1 λ pir é sensível. Porém a
270 tetraciclina é um antibiótico que degrada rapidamente na presença da luz, o
271 que dificultou o seu uso.

272 O uso de ágar MacConkey na conjugação, ao invés de ágar LB, como
273 usado por Li *et al.* (14), foi uma opção quando descobriu-se haver uma
274 diferença de coloração entre as colônias da MT 78 e da *E. coli* S17-1 λ pir, o
275 que facilitou a visualização e a seleção dos mutantes.

276 Trés tempos diferentes de incubação foram testados para o método
277 da conjugação: 6 horas, 8 horas e ~16 horas durante a noite. Os tempos de
278 8 e 16 horas de incubação resultaram em crescimento nulo, contrariando o
279 resultado de Li *et al.* (14). Já o tempo de 6 horas resultou em crescimento de
280 cerca de 100 colônias de mutantes por placa.

281 Diversos experimentos foram feitos ao longo do trabalho para
282 comprovar a eficácia e a durabilidade dos antibióticos escolhidos. Diversas
283 vezes tentou-se repicar a cepa MT 78 em meio contendo canamicina, mas
284 não houve crescimento em nenhuma das tentativas, nem mesmo quando
285 foram usadas placas de ágar com o antibiótico preparadas há mais de um
286 mês, o que comprova a eficácia e a durabilidade da canamicina.

287 Para os ensaios de invasão, foi testado centrifugar as placas de
288 células a 500 x g por 10 minutos após a infecção, para que a adesão entre
289 as células e as bactérias fosse mais rápida, mas o resultado foi semelhante
290 ao encontrado em infecção sem centrifugação, por isso esse recurso não foi
291 utilizado. Ainda sobre os ensaios de invasão, os resultados obtidos estão de
292 acordo com os encontrados por Matter *et al.* (15), e o número final de
293 colônias recuperadas das células (10.000 sem diluição) é o semelhante ao
294 obtido por Li *et al.* (14).

295 Além dos ensaios de invasão com os demais 10 *pools* de mutantes
296 ainda não-testados, serão realizados ensaios de competitividade entre a
297 cepa selvagem e os mutantes atenuados por virulência.

298 Existe a possibilidade, também, de utilizar a biblioteca de mutantes
299 para uma triagem aumentando a chance de obter mutantes atenuados

300 devido à maior complexidade dos sistemas de defesa e barreiras
301 imunológicas do modelo animal em relação ao modelo celular.

302 Após concluídos todos os ensaios de invasão *in vitro*, o DNA dos
303 mutantes recuperados será extraído, e será feita hibridização DNA-DNA (*dot*
304 *blot*) para identificar quais deles invadiram fibroblastos aviários CEC-32 (14).
305 Os mutantes ausentes nos *pools* de recuperação devem ter tido sua
306 virulência atenuada pela *tag* inserida no seu genoma, sendo incapazes de
307 invadir os fibroblastos CEC-32. Esses mutantes serão sequenciados para
308 que se descubra qual região do genoma foi interrompida pela *tag* (14).

309 Tais experimentos poderão [1] identificar genes da MT78 essenciais à
310 invasão de células não-fagocitárias [2] levar à identificação de novos genes
311 de virulência para APEC; [3] identificar, em APEC, genes de virulência
312 descritos para outras bactérias; [4] encontrar algum gene que possibilite a
313 caracterização de uma cepa APEC frente a outras ExPEC.

314 Independentemente de resultados futuros, esse trabalho possibilitou a
315 criação de uma biblioteca de mutantes que poderá ser usada em diversos
316 outros experimentos, permitiu o desenvolvimento de novos protocolos de
317 conjugação e confecção de mutantes e reproduziu resultados de ensaios de
318 invasão de fibroblastos aviários obtidos em outros trabalhos. Portanto,
319 representa uma forma de melhor entender a cepa MT 78, bem como da
320 relação dessa cepa com o seu modelo *in vitro* de invasão celular.

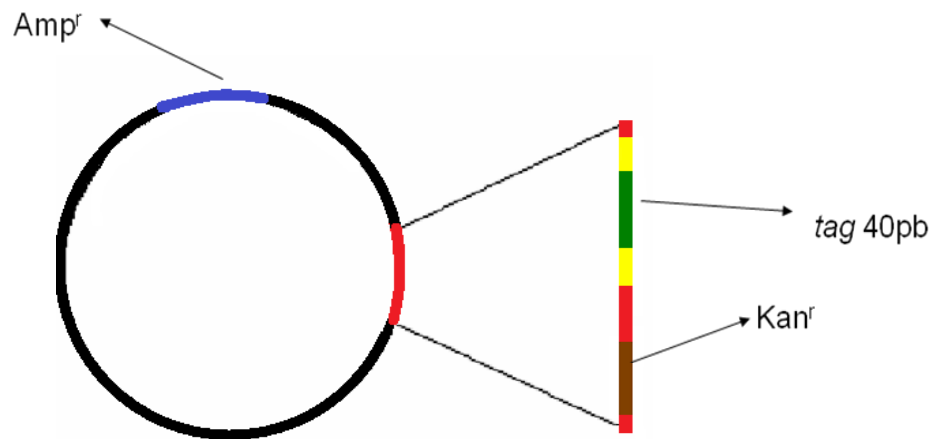
321

322 REFERÊNCIAS

- 323 1. **Allan, B. J., J. V. v. d. Hurk, and A. A. Potter.** 1993. Characterization
324 of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis.
325 Canadian Journal of Veterinary Ressearch **57**:146-151.
- 326 2. **Antão, E.-M., C. Ewers, D. Gürlebeck, R. Preisinger, T. Homeier,**
327 **G. Li, and L. H. Wieler.** 2009. Signature-Tagged Mutagenesis in a
328 Chicken Infection Model Leads to the Identification of a Novel Avian
329 Pathogenic *Escherichia coli* Fimbrial Adhesin. PLoS One **4**:1-14.
- 330 3. **Barbieri, N. L.** 2010. Resistência a antibióticos, prevalência dos
331 fatores associados à virulência, tipagem filogenética e perfil
332 filogenético de isolados de *Escherichia coli* patogênica aviária
333 (APEC). UFRGS, Porto Alegre.
- 334 4. **Barnes, H. J., J. P. Vaillancourt, and W. B. Gross.** 2003.
335 Colibacillosis, p. 631-656. *In* Hofstad (ed.), Diseases of Poultry. Iowa
336 State University Press, Ames.
- 337 5. **Cheville, N. F., and L. H. Arp.** 1978. Comparative pathologic findings
338 of *Escherichia coli* infection in birds. Journal of the American
339 Veterinary Medicine Association **173**:584-587.
- 340 6. **De Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis.** 1990.
341 Mini-Tn5 Transposon Derivates for Insertion Mutagenesis, Promoter
342 Probing, and Chromosomal Insertion of Cloned DNA in Gram-
343 Negative Eubacteria. Journal of Bacteriology **172**:6568-6572.
- 344 7. **De Lorenzo, V., and K. N. Timmis.** 1994. Analysis and Construction
345 of Stables Phenotypes in Gram-Negative Bacteria with Tn5- and

- 346 Tn10-Derivated Minitransposons, p. 386 - 405. Genetics and
347 Regulation.
- 348 8. **Dho, M., and J. P. Lafont.** 1982. *Escherichia coli* Colonization of the
349 Trachea in Poultry: Comparison of Virulent and Avirulent Strains in
350 Gnotoxenic Chickens. Avian Diseases **26**:787-797.
- 351 9. **Dziva, F., and M. P. Stevens.** 2008. Colibacillosis in poultry:
352 unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic
353 *Escherichia coli* in their natural hosts. Avian Pathology **37**:355- 366.
- 354 10. **Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, and D.**
355 **W. Holden.** 1995. Simultaneous Identification of Bacterial Virulence
356 Genes by Negative Selection. Science **269**:400-403.
- 357 11. **Horn, F., S. Glodde, G. Li, K. D. Weyrauch, L. H. Wieler, and C.**
358 **Ewers.** 2007. Colonization of chicken lung by avian pathogenic strais
359 of *Escherichia coli* is accompanied by apoptosis. X IUBMB
360 Conference e XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for
361 Biochemistry and Molecular Biology. Salvador, Brazil.
- 362 12. **Kaaden, O. R., S. Lange, and B. Stiburek.** 1982. Establishment and
363 characterization of chicken embryo fibroblast clone LSCC-H32. In
364 Vitro **18**:827-834.
- 365 13. **La Regione, L. M., and M. J. Woodward.** 2002. Virulence factors of
366 *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia.
367 Research in Veterinary Science **73**:27-35.
- 368 14. **Li, G., C. Laturus, C. Ewers, and L. H. Wieler.** 2005. Identification
369 of Genes Required for Avian *Escherichia coli* Septicemia by

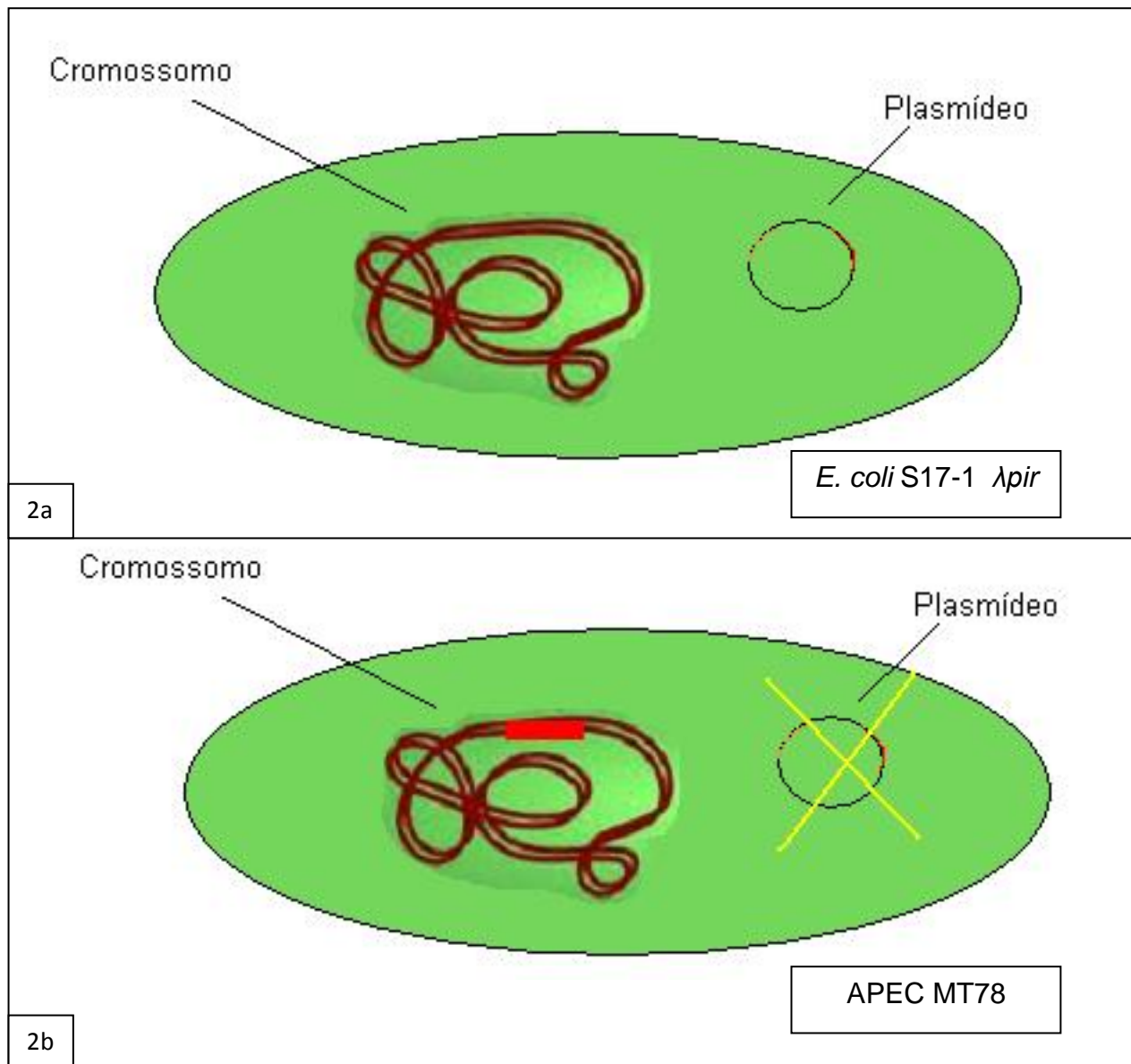
- 370 Signature-Tagged Mutagenesis. *Infection and Immunity* **73**:2818-
371 2827.
- 372 15. **Matter, L. B., N. L. Barbieri, M. Nordhoff, C. Ewers, and F. Horn.**
373 2010. Avian Pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken
374 fibroblasts. *Veterinary Microbiology*.
- 375 16. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. Plasmids. *In* C. S. Harbor
376 (ed.), *Molecular Cloning - A laboratory manual*, vol. 1. New York.
- 377
- 378
- 379



381

382 Figura 1. Esquema do plasmídeo pUTmini-Tn5km2 com os genes e
383 sequências relevantes nesse estudo.

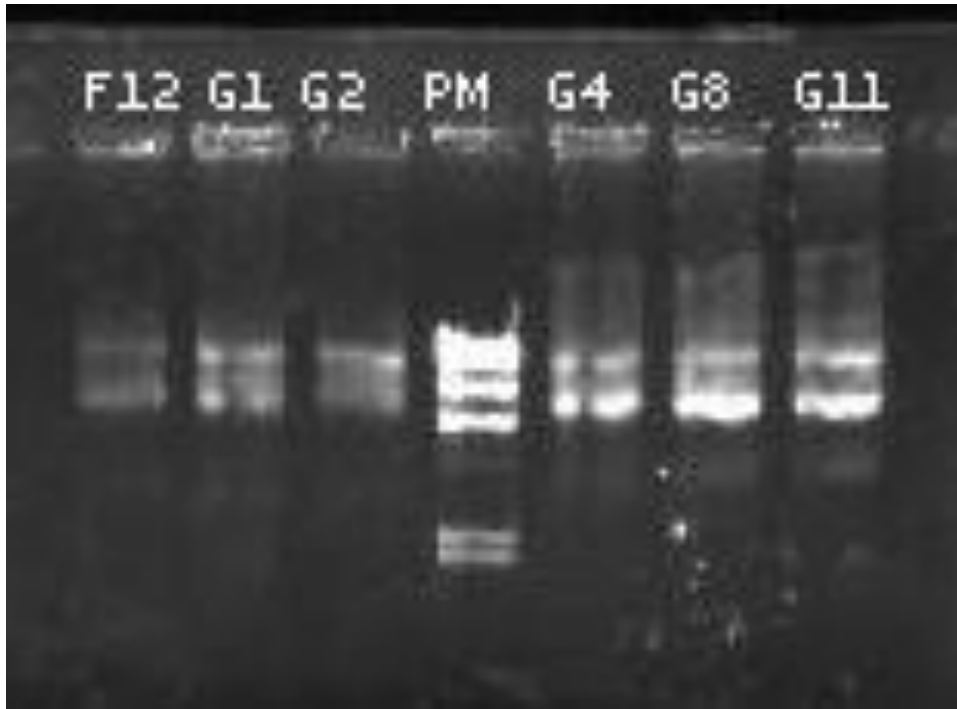
384



385

386 Figura 2. Esquema de comportamento do plasmídeo pUTmini-Tn5km2
 387 nas cepas *E. coli* S17-1 λpir (2a) e APEC MT78 (2b).

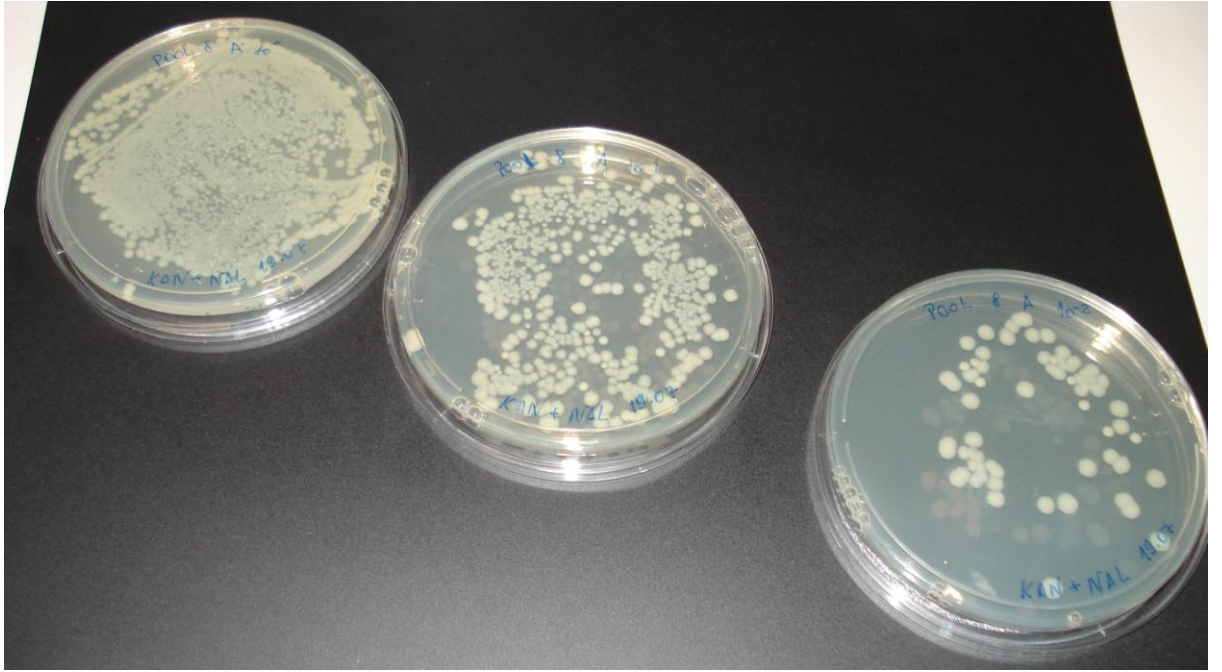
388



389

390 Figura 3. Gel dos plasmídeos F12, G1, G2, G4, G8 e G11 extraídos
391 da *E. coli* S17-1 λ pir após transformação. A canaleta “PM” é a do padrão de
392 peso molecular do genoma do fago λ digerido com a enzima de restrição
393 HindIII. A banda superior de cada amostra demonstra a presença do
394 plasmídeo torcido; a banda inferior, do plasmídeo supertorcido.

395

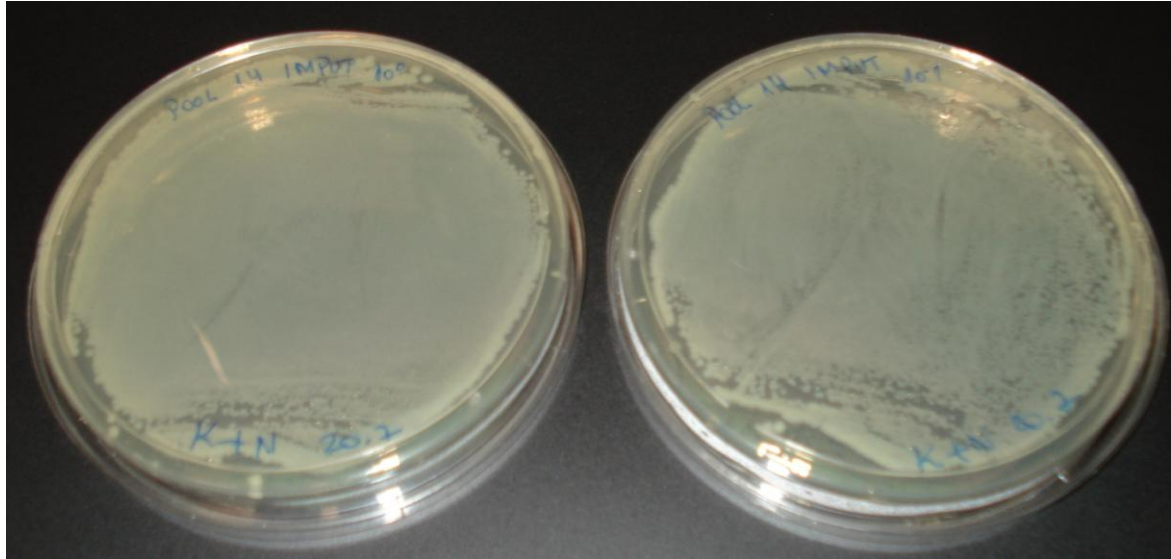


396

397 Figura 4. *Pool* de recuperação do *pool* 18 de mutantes.

398 Concentrações: 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} , da esquerda para a direita.

399

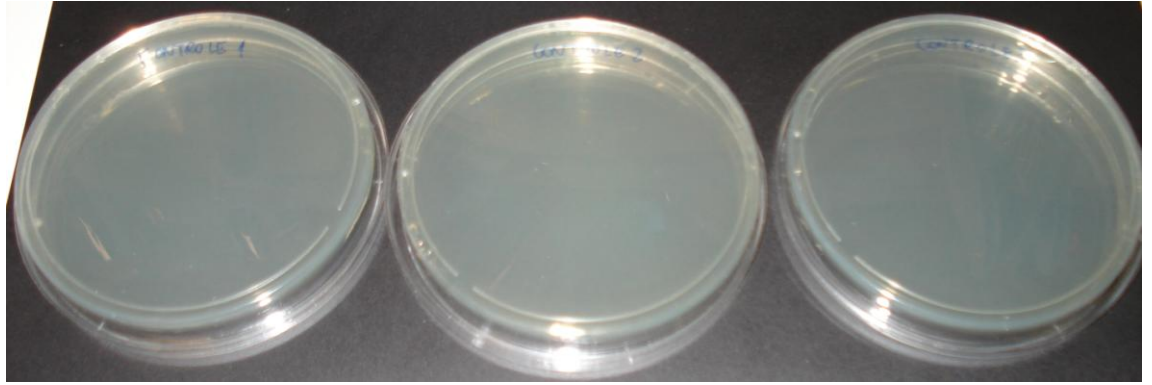


400

401 Figura 5. *Pool* de infecção do pool 14 de mutantes. Concentrações:

402 10^0 e 10^{-1} , da esquerda para a direita.

403

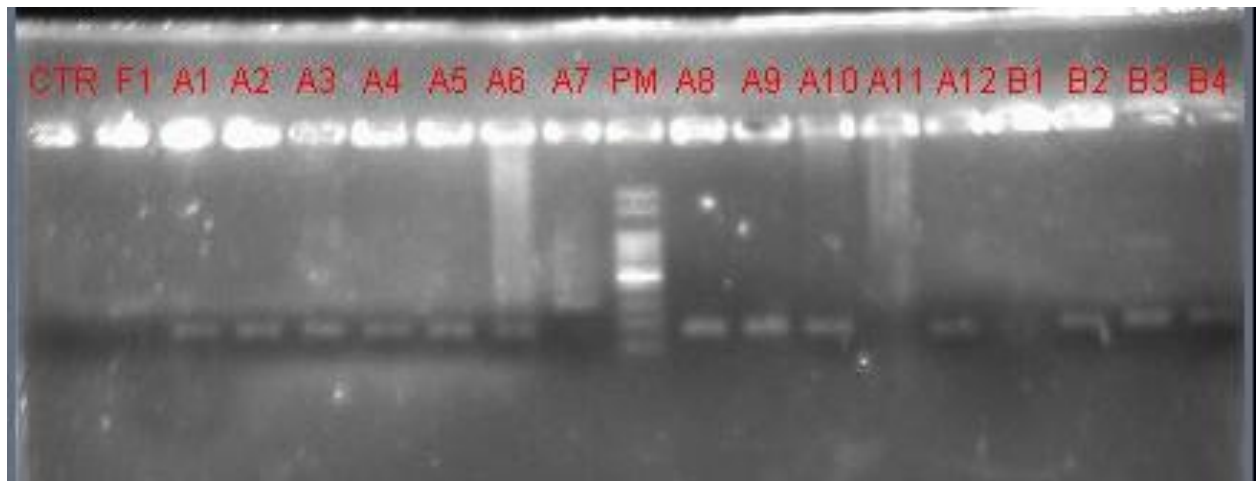


404

405 Figura 6. Controles do experimento, nos quais não há crescimento de

406 UFC.

407



408

409 Figura 7. *Tags* amplificadas dos plasmídeos A1, A2, A3, A4, A5, A6,
410 A8, A9, A10, A12, B2, B3 e B4. As *tags* das amostras F1, A7, A11 e B1
411 foram amplificadas em outra reação. O padrão de peso molecular utilizado é
412 de 50 pb, sendo a banda mais intensa de 250 pb e cada fragmento acima ou
413 abaixo representa 50 pb a mais ou a menos. O fragmento amplificado possui
414 80 pb, correspondente às *tags*, de 40 pb, somadas às sequências fixas de
415 20 pb *upstream* e *downstream*. Não houve amplificação no controle negativo
416 (CTR).

3. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O aperfeiçoamento de técnicas já existentes e a aprendizagem de outras que não eram antes desenvolvidas no laboratório de Microbiologia Celular levaram à padronização das técnicas para a confecção da biblioteca de mutantes, e a construção da biblioteca em si. Esses foram os principais resultados desse trabalho.

A introdução de novas metodologias experimentais em um laboratório permite novas abordagens para as pesquisas nele desenvolvidas. Entretanto, há dificuldades inerentes a esse processo, especialmente no momento em que são realizadas as atividades práticas. Por essa razão, algumas etapas ainda não foram realizadas, mas os resultados atingidos validam esse estudo como um trabalho de conclusão.

A próxima etapa a ser desenvolvida é a extração de DNA dos *pools* de infecção e de recuperação obtidos nos ensaios de invasão já executados. Para isso, será usado um protocolo que permite a extração de DNA de cerca de 10^{10} células bacterianas (quantidade encontrada nos *pools* de infecção), utilizando CTAB, proteinase K, fenol:clorofórmio:isomilálcool e outros reagentes. O DNA extraído será submetido à reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores P2 e P4, para amplificação das *tags*. O DNA amplificado passará por nova reação de PCR, dessa vez utilizando-se de nucleotídeos marcados com fluorescência. Será feita uma digestão do DNA fluorescente amplificado com HindIII, para que sejam retiradas as sequências de 20 pb *up-* e *downstream*, de modo que as *tags* fiquem apenas com seus 40 pb para a hibridização (39).

Utilizando as membranas de nylon com DNA fixado, já produzidas, como sondas, será feita hibridização DNA-DNA (*dot blot*) para cada amostra de DNA extraído dos *pools*, e o resultado do pool de recuperação será comparado ao do *pool* de infecção para cada experimento (39). Desse modo serão identificados os mutantes presentes na infecção e ausentes na recuperação, ou seja, aqueles que não invadiram os fibroblastos.

Mutantes não-invasivos resultam da virulência atenuada, devido à *tag* inserida no seu genoma. É a partir da identificação desses mutantes que serão definidos os rumos desse trabalho, que visa identificar qual(is) é(são) o(s) gene(s) essencial(is) para que a cepa APEC MT 78 invada fibroblastos aviários de linhagem CEC-32.

4. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

1. **Agüero, M. E., L. Aron, A. G. DeLuca, K. N. Timmis, and F. C. Cabello.** 1984. A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. *Infection and Immunity* **46**:740-746.
2. **Allan, B. J., J. V. v. d. Hurk, and A. A. Potter.** 1993. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Canadian Journal of Veterinary Research* **57**:146-151.
3. **Antão, E.-M., C. Ewers, D. Gürlebeck, R. Preisinger, T. Homeier, G. Li, and L. H. Wieler.** 2009. Signature-Tagged Mutagenesis in a Chicken Infection Model Leads to the Identification of a Novel Avian Pathogenic *Escherichia coli* Fimbrial Adhesin. *PLoS One* **4**:1-14.
4. **Antão, E. M., L. H. Wieler, and C. Ewers.** 2009. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens* **1**:1-12.
5. **Arné, P., D. Marc, A. Bree, C. Schouler, and M. Dho-Moulin.** 2000. Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a fimH deletion. *Avian Diseases* **44**:343-355.
6. **Barbieri, N. L.** 2010. Resistência a antibióticos, prevalência dos fatores associados à virulência, tipagem filogenética e perfil filogenético de isolados de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC). UFRGS, Porto Alegre.
7. **Barnes, H. J., J. P. Vaillancourt, and W. B. Gross.** 2003. Colibacillosis, p. 631-656. *In* Hofstad (ed.), *Diseases of Poultry*. Iowa State University Press, Ames.

8. **Bliss, J. M., C. F. Garon, and R. P. Silver.** 1996. Polysialic acid export in *Escherichia coli* K1: the role of KpsT, the ATP-binding component of an ABC transporter, in chain translocation. *Glycobiology* **6**:445-452.
9. **Bonacorsi, S., O. Clermont, V. Houdouin, C. Cordevant, N. Brahimi, A. Marecat, C. Tisley, X. Nassif, M. Lange, and E. Bingen.** 2003. Molecular analysis and experimental virulence of French and North American *Escherichia coli* neonatal meningitis isolates: identification of a new virulent clone. *The Journal of Infectious Diseases* **187**:1895-1906.
10. **Cheville, N. F., and L. H. Arp.** 1978. Comparative pathologic findings of *Escherichia coli* infection in birds. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* **173**:584-587.
11. **Cortes, M. A., J. Gibon, N. K. Chanteloup, M. Moulin-Schouleur, P. Gilot, and P. Germon.** 2008. Inactivation of *ibeA* and *ibeT* results in decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908. *Infection and Immunity* **76**:4129-4136.
12. **De Ricke, J., A. Milon, and E. Oswald.** 1999. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Veterinary Research* **2**:299-316.
13. **Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research* **30**:299-316.

14. **Dho, M., and J. P. Lafont.** 1984. Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks. Avian Diseases **28**:1016-1025.
15. **Dho, M., and J. P. Lafont.** 1982. *Escherichia coli* Colonization of the Trachea in Poultry: Comparison of Virulent and Avirulent Strains in Gnotoxenic Chickens. Avian Diseases **26**:787-797.
16. **Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Brée, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. C. III.** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. Infection and Immunity **68**:4145-4154.
17. **Dziva, F., and M. P. Stevens.** 2008. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. Avian Pathology **37**:355- 366.
18. **Ewers, C., E.-M. Antão, I. Diehl, H.-C. Philipp, and L. H. Wieler.** 2009. Intestine and Environment of the Chicken as Reservoirs for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains with Zoonotic Potential. Applied Environmental Microbiology **75**:184-192.
19. **Ewers, C., G. Li, H. Wlinking, S. Kiebling, K. Alta, E.-M. Antão, C. Laternus, I. Diehla, S. Glodde, T. Homeiera, U. Bohnke, H. Steinru, H.-C. Philipp, and L. H. Wieler.** 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? International Journal of Medical Microbiology **297**:163-176.

20. **Falkow, S.** 1991. Bacterial Entry into Eukaryotic Cells. *Cell*:1099-1102.
21. **Ferreira, A. J., and T. Knöbl.** 2000. Colibacilose aviária, p. 197-205. *In* A. M. Berchieri, M. (ed.), Doenças das Aves. FACTA, Campinas.
22. **Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**:136-169.
23. **Fleckenstein, J. M., D. J. Kopecko, R. L. Warren, and E. A. Elsinghort.** 1996. Molecular characterization of the tia invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **64**.
24. **Germon, P., Y. Chen, L. He, J. E. Blanco, A. Brée, C. Schouler, S. Huang, and M. Moulin-Schouleur.** 2005. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **151**:1179-1186.
25. **Gross, W. B.** 1961. The development of "air sac disease". *Avian Diseases* **5**:431-439.
26. **Guyer, D. M., I. R. Henderson, J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley.** 2000. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **38**:53-66.
27. **Heimer, S. R., D. A. Rasko, C. V. Locketell, D. E. Johnson, and H. L. Mobley.** 2004. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infection and Immunity* **72**:593-597.

28. **Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, and D. W. Holden.** 1995. Simultaneous Identification of Bacterial Virulence Genes by Negative Selection. *Science* **269**:400-403.
29. **Horn, F., S. Glodde, G. Li, K. D. Weyrauch, L. H. Wieler, and C. Ewers.** 2007. Colonization of chicken lung by avian pathogenic strains of *Escherichia coli* is accompanied by apoptosis. X IUBMB Conference e XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Salvador, Brazil.
30. **Johnson, J. R., and T. A. Russo.** 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* **295**:383-404.
31. **Johnson, T. J., S. J. Johnson, and L. K. Nolan.** 2006. Complete DNA Sequence of a ColBM Plasmid from Avian Pathogenic *Escherichia coli* Suggests that It Evolved from Closely Related ColV Virulence Plasmids. *Journal of Bacteriology* **188**:5975-5983.
32. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews - Microbiology* **2**:123-140.
33. **Kariyawasam, S., T. J. Johnson, C. Debroy, and L. K. Nolan.** 2006. Occurrence of pathogenicity island I (APEC-O1) genes among *Escherichia coli* implicated in avian colibacillosis. *Avian Diseases* **50**:405-410.
34. **Kim, K. S.** 2001. *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. *Infection and Immunity* **69**:5217-5222.
35. **Kim, K. S.** 2008. Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier. *Nature Reviews - Microbiology* **625-634**.

36. **Kim, K. S.** 2003. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nature Reviews - Neuroscience* **4**:376-385.
37. **Klemm, P., V. Hancock, and M. A. Schembri.** 2010. Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. *Environmental Microbiology Reports* **2**:628-640.
38. **La Ragione, L. M., and M. J. Woodward.** 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Research in Veterinary Science* **73**:27-35.
39. **Li, G., C. Laturus, C. Ewers, and L. H. Wieler.** 2005. Identification of Genes Required for Avian *Escherichia coli* Septicemia by Signature-Tagged Mutagenesis. *Infection and Immunity* **73**:2818-2827.
40. **Matter, L. B., N. L. Barbieri, M. Nordhoff, C. Ewers, and F. Horn.** 2010. Avian Pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken fibroblasts. *Veterinary Microbiology*.
41. **Mazurkiewicz, P., C. M. Tang, C. Boone, and D. W. Holden.** 2006. Signature-tagged mutagenesis: barcoding mutants for genome-wide screens. *Nature Reviews - Genetics* **7**:929-939.
42. **Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. C. III, P. K. Brown, P. Arné, A. Brée, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 2003. Role of Virulence Factors in Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* to Serum and in Pathogenicity. *Infection and Immunity* **71**:536-540.
43. **Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. C. III, B. Lehoux, and J. M. Fairbrother.** 2003. Role of avian pathogenic *Escherichia coli*

- virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infection and Immunity* **71**:494-503.
44. **Moulin-Schouler, M., C. Schouler, P. Tailliez, M. Kao, A. Breé, P. Germon, E. Oswald, J. Mainil, M. Blanco, and J. Blanco.** 2006. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *Journal of Clinical Microbiology* **44**:3484-3492.
45. **Nagai, S., T. Yagihashi, and A. Ishihama.** 1998. An avian pathogenic *Escherichia coli* strain produces a hemolysin, the expression of which is dependent on cyclic AMP receptor protein gene function. *Veterinary Microbiology* **60**:227-238.
46. **Nolan, L. K., S. M. Horne, C. W. Giddings, S. L. Foley, T. J. Johnson, A. M. Lynne, and J. Skyberg.** 2003. Resistance to serum complement, *iss* and virulence of avian *Escherichia coli*. *Veterinary Research Communications* **27**:101-110.
47. **Parreira, V. R., and C. L. Gyles.** 2003. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infection and Immunity* **71**:5087-5096.
48. **Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doizé, and J. M. Fairbrother.** 1997. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Veterinary Microbiology* **58**:195 - 213.
49. **Pramoonjago, P., M. Kaneko, T. Kinoshita, E. Ohtsubo, J. Takeda, K. S. Hong, R. Inagi, and K. Inoue.** 1992. Role of TraT protein, an

- anticomplementary protein produced in *Escherichia coli* by R100 factor, in serum resistance. *Journal of Immunology* **148**:827-836.
50. **Provence, D. L., and R. Curtiss.** 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity* **62**:1369-1380.
 51. **Reis, R. S., and F. Horn.** 2010. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Samonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathogens* **2**.
 52. **Russo, T. A., U. B. Carlino, and J. R. Johnson.** 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **69**:6209-6216.
 53. **Sabri, M., M. Caza, J. Proulx, M. H. Lymberopoulos, A. Brée, M. Moulin-Schouleur, R. C. III, and C. M. Dozois.** 2008. Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infection and Immunity* **76**:601-611.
 54. **Sauer, F. G., M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. J. Martinez, and S. J. Hultgren.** 2000. Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* **3**:65-72.
 55. **Skyberg, J. A., T. J. Johnson, J. R. Johnson, C. Clabots, C. M. Logue, and L. K. Nolan.** 2006. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infection and Immunity* **74**:6287-6292.

56. **Smith, S. G. J., V. Mahon, M. A. Lambert, and R. P. Fagan.** 2007. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiology Letters* **273**:1-11.
57. **Sorsa, L. J., S. Dufke, J. Heesemann, and S. Schubert.** 2003. Characterization of an iroBCDEN gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. *Infection and Immunity* **71**:3285-3293.
58. **Stathopoulos, C., D. L. Provence, and R. Curtiss.** 1999. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infection and Immunity* **67**:772-781.
59. **Stawski, G., L. Nielsen, F. Orskov, and I. Orskov.** 1990. Serum sensitivity of a diversity of *Escherichia coli* antigenic reference strains. Correlation with an LPS variation phenomenon. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* **98**:828-838.
60. **Stordeur, P., A. Bree, J. Mainil, and M. Moulin-Schouler.** 2004. Pathogenicity of *pap*-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicaemic lesions. *Microbes and Infection* **6**:637-645.
61. **Stordeur, P., D. Marlier, J. Blanco, E. Oswald, F. Biet, M. Dhomoulin, and J. Mainil.** 2002. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesion genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli* *Veterinary Microbiology* **84**:231-241.
62. **Tivendale, K. A., J. L. Allen, C. A. Ginns, B. S. Crabb, and G. F. Browning.** 2004. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh* with plasmid

mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. Infection and Immunity **72**:6554-6560.

63. **Van Dijk, W. C., H. A. Verbrugh, M. E. V. D. Tol, R. Peters, and J. Verhoef.** 1979. Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonisation. Infection and Immunity **25**:603-609.
64. **Vokes, S., S. A. Reeves, A. G. Torres, and S. M. Payne.** 1999. The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. Molecular Microbiology **33**:63-73.
65. **Zhao, L., S. Gao, H. Huan, X. Xu, X. Zhu, W. Yang, Q. Gao, and X. Lui.** 2009. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. Microbiology **155**:1634-1644.