

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Gerson Nakazato

“ESTUDO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE
AMOSTRAS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICAS DE
ORIGEM AVIÁRIA (APEC)”

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Campinas
2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

N145e	<p>Nakazato, Gerson</p> <p>Estudos dos fatores de virulência de amostras de <i>Escherichia coli</i> patogênicas de origem aviária (APEC) / Gerson Nakazato. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.</p> <p>Orientador: Wanderley Dias da Silveira. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Escherichia coli</i>. 2. Fatores de virulência. 3. Patogenicidade. 4. Adesão. 5. Ave. I. Silveira, Wanderley Dias da. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
--------------	--

Título em inglês: Study of the virulence factors from avian pathogenic *Escherichia coli* strains (APEC).

Palavras-chave em inglês: *Escherichia coli*; Virulence factors; Pathogenicity; Adhesion; Avian.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

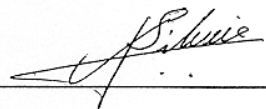
Banca examinadora: Wanderley Dias da Silveira, Antonio Fernando Pestana de Castro, Marcelo Palma Sircili, Fabiana Fantinatti Garboggini, Marcelo Brocchi.

Data da defesa: 18/05/2006.

Campinas, 18 de Maio de 2006.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira (Orientador)
(Titular)

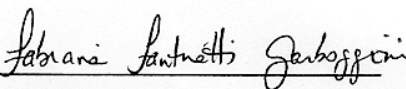


Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro
(Titular)

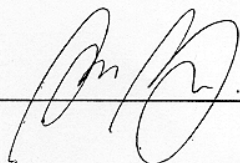


Profa. Dra. Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral
(Titular)

Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini
(Titular)



Prof. Dr. Marcelo Brocchi
(Titular)



Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili
(Suplente)



Prof. Dr. Domingos da Silva Leite
(Suplente)

Profa. Dra. Clarice Weis Arns
(Suplente)

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Para a sua realização, nos foi concedida bolsa de doutorado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 10790-1).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela orientação, amizade, apoio e sobretudo, pela sabedoria transmitida.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, pelo apoio, amizade e por participar na Banca Examinadora da Tese.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pelo apoio, e por participar na Pré-Banca e Banca Examinadora da Tese.

À Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini, pelo apoio, e por participar na Pré-Banca e Banca Examinadora da Tese.

Ao Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili, pelo apoio, e por participar na Banca Examinadora da Tese.

À Profa. Dra. Clarice Weis Arns, pelo apoio, e por participar no Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pelo apoio, e por participar como suplente da Banca Examinadora da Tese.

À Prof. Dr. Tomomasa Yano, pelo apoio durante a tese, e por participar como suplente da Pré-Banca.

À Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, pelo apoio durante o Programa de Estágio Docente (PED).

À Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci, pelo apoio durante a tese.

À Profa. Dra. Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral, pelo apoio, e por participar como suplente da Banca Examinadora da Tese.

Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, ao Juarez e à Lucinha, pela ajuda no teste de FAS.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, pelos ensinamentos e auxílio na realização deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratórios, Alessandra, Arlete, Gisele, Isildinha, Juliana, Lancellotti, Mário Paulo, Michelle e Tatiana, pela ajuda e amizade.

A todos os amigos do Departamento de Microbiologia, pela ajuda durante a tese.

À Lúcia e Lourdes, por toda ajuda e atenção.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, pela ajuda durante a tese.
À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo carinho, compreensão e apoio durante a tese.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVOS	11
3- MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1- Linhagens bacterianas	11
3.2- Linhagens controles	13
3.3- Meios de cultura	14
3.4- Soluções	16
3.5- Géis	22
3.6- Métodos	23
3.6.1- Preservação das amostras bacterianas	23
3.6.2- Seleção das linhagens de APEC a serem estudadas	23
3.6.2.1- REP-PCR	23
3.6.3- Caracterização das linhagens selvagens e da HB101	25
3.6.3.1- Determinação do nível de resistência antimicrobiana	25
3.6.3.2- Determinação da produção de colicinas	25
3.6.3.3- Determinação do perfil plasmidial	26
3.6.3.4- Teste de adesão em células HEp-2 e HeLa	27
3.6.3.5- Teste de invasão em células HeLa e HEp-2	28
3.6.3.6- Reação em cadeia da polimerase	29
3.6.3.7- Determinação do perfil de proteínas de superfície	33
3.6.3.8- Microscopia Eletrônica de Transmissão	34
3.6.3.9- Microscopia Eletrônica de Varredura	35
3.6.3.10- Teste de “Fluorescence Actin Staining” (FAS)	36

3.6.4- Conjugação entre linhagens selvagens e a receptora HB101	37
3.6.5- Mutagenização com o transposon TnpHoA	38
3.6.6- Caracterização das amostras transconjugantes e mutantes obtidas	38
4- RESULTADOS	39
4.1- REP-PCR	39
4.2- Caracterização das linhagens de APEC selecionadas e da receptora HB101	41
4.2.1- Resistência aos antimicrobianos, produção de colicinas, adesão e invasão em células HEp-2 e HeLa	41
4.2.2- Perfil plasmidial das linhagens selvagens e da receptora HB101	43
4.2.3- PCR para os fatores de virulência linhagens de APEC selecionadas e da receptora HB101	43
4.3- Conjugação	47
4.4- Caracterização das amostras transconjugantes	48
4.4.1- Perfil plasmidial das amostras transconjugantes	48
4.4.2- Resistência aos antimicrobianos, produção de colicinas, adesão e invasão em células HEp-2 e HeLa	51
4.4.3- PCR para os fatores de virulência das amostras transconjugantes	55
4.5- Mutagenização da amostra transconjugante S17-1 com o transposon TnpHoA ...	57
4.5.1- Perfil plasmidial das amostras mutantes	57
4.5.2- Teste de adesão das amostras mutantes em células HEp-2 e HeLa	59
4.5.3- PCR para os fatores de virulência das amostras mutantes	62
4.6- Perfil de proteínas de superfície	62
4.7- Microscopia Eletrônica de Transmissão	66
4.8- Microscopia Eletrônica de Varredura	69
4.9- Teste de “Fluorescence Actin Staining” (FAS)	70
5- DISCUSSÃO	71
6- CONCLUSÕES	79
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
8- ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	92

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I-	Linhagens iniciais de APEC e normais utilizadas no estudo e suas respectivas resistências a antimicrobianos	12
Tabela II-	Linhagens utilizadas no estudo como controles	13
Tabela III-	Concentração dos reagentes do teste REP-PCR	24
Tabela IV-	Iniciadores utilizados no estudo (descrição, seqüência, temperatura de anelamento, tamanho do fragmento amplificado e referência de cada iniciador)	30
Tabela V-	Concentração dos reagentes utilizados no teste de PCR	32
Tabela VI-	Caracterização biológica das linhagens selvagens e linhagem HB101...	41
Tabela VII-	Resultados das conjugações entre as linhagens selvagens e a receptora HB101	47
Tabela VIII-	Caracterização biológica das amostras transconjugantes	51
Tabela IX-	Resultado do teste de invasão (placas de Mac Conkey) da linhagem S17 e suas derivadas	52
Tabela X-	Resultados da Microscopia Eletrônica de Transmissão das linhagens S17, S17-1, Mut.43 e a receptora HB101	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-	Foto do gel do REP-PCR das linhagens de APEC e normais	39
Figura 2-	Dendrograma das linhagens APEC e normais, utilizando iniciadores REP-PCR	40
Figura 3-	Fotos do teste de adesão e invasão em células HeLa e HEp-2, cultivadas <i>in vitro</i> das linhagens selvagens e da receptora HB101	42
Figura 4-	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do teste de PCR para o gene <i>tsh</i>	44
Figura 5-	Eletroforese em gel de agarose a 1,0% do teste de PCR para o gene <i>iucA</i>	45
Figura 6-	Eletroforese em gel de agarose a 1,0% do teste de PCR para o gene <i>fepC</i>	46
Figura 7-	Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose a 0,8% (linhagem S17)	48
Figura 8-	Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose a 0,8% (linhagem S21)	49
Figura 9-	Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose a 0,8% (linhagem SC110) .	50
Figura 10-	Teste de invasão (placas de Mac Conkey) da linhagem S17 e derivadas	52
Figura 11-	Foto do teste de adesão da linhagem S17-1 (transconjugante) em células HEp-2 (com D-manose)	53
Figura 12-	Foto do teste de adesão da linhagem S17-1 (transconjugante) em células HeLa (com D-manose)	54
Figura 13-	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do teste de PCR para o gene <i>csgA</i>	55
Figura 14-	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do teste de PCR para o gene <i>crl</i>	56
Figura 15-	Perfil plasmidial (agarose 0,7%) das amostras mutantes de números 43 e 48, comparados com as linhagens originais e padrões	58
Figura 16-	Teste de adesão da amostra transconjugante S17-1 em células HeLa (com D-manose)	60
Figura 17-	Teste de adesão da amostra Mut.43 (perda da adesão) em células HeLa (com manose)	61

Figura 18- Gel de poliacrilamida (12,5 %) corada pela prata com proteínas de superfície das linhagens selvagens, HB101 e transconjugantes (meio LA)	63
Figura 19- Gel de poliacrilamida (12,5 %) corada pela prata com proteínas de superfície das linhagens S17, S17-1, Mut.43 e HB101 (meios Minca, BHI, TSA)	64
Figura 20- Gel de poliacrilamida (12,5 %) corada pela prata com proteínas de superfície das linhagens S17, S17-1, Mut.43 e HB101 (meios LA e Ágar Sangue)	65
Figura 21- Microscopia Eletrônica de Transmissão (coloração negativa) da amostra S17-1 (transconjugante)	67
Figura 22- Microscopia Eletrônica de Transmissão (coloração negativa) da Mut.43	68
Figura 23- Fotos do teste de adesão e invasão em células HEp-2 das linhagens selvagens da receptora HB101 através da técnica de “scanning electron microscopy” (SEM)	69
Figura 24- Fotos do teste de FAS da adesão com 6 horas (sem manose) em células HEp-2	70

RESUMO

Duas linhagens de *Escherichia coli* patogênicas isoladas de aves (APEC) com sinais clínicos de septicemia (S17 e S21) e uma isolada de aves com sinais clínicos de Síndrome de Cabeça Inchada (SCI10) foram selecionadas, do conjunto de 49 linhagens pertencentes ao Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana, após a caracterização das mesmas quanto à presença das capacidades de adesão e invasão em células HEp-2 e HeLa, perfil de resistência a diferentes antimicrobianos, presença de genes (detectados por PCR) relacionados à patogenicidade, e perfil de DNA plasmidial. Teste de REP-PCR também foi realizado para separação destas linhagens em grupos clonais. Os plasmídios dessas linhagens foram transferidos, através de conjugação, para a linhagem receptora não patogênica, *E. coli* HB101. A análise das amostras recombinantes obtidas, através das características estudadas, demonstrou que somente aquelas transconjugantes derivadas da linhagem S17, uma delas denominada de S17-1, apresentaram adesão e invasão nessas culturas celulares utilizadas, indicando que os genes responsáveis por estas características estão localizados no plasmídio que foi transferido (70 MDa). Pelo fato das capacidades de adesão e invasão das linhagens S21 e SCI10 não terem sido detectadas em transconjugantes em que ocorreram as transferências de plasmídios existentes nestas duas linhagens, indica que os genes responsáveis por estas características não são plasmídio-mediado, podendo, ou serem cromossômicos, ou mesmo serem plasmidiais, porém com controle de genes cromossômicos. A mutação da amostra S17-1, com o transposon TnphoA levou à perda das capacidades de adesão e/ou invasão em células HEp-2 e HeLa, o que indica que o processo de inserção do transposon tenha ocorrido em genes relacionados aos processos citados. O gene *tsh* (hemaglutinina termo-sensível) presente na linhagem S21, e os genes relacionados ao sistema de aerobactina presentes nas linhagens SCI10 (*fepC*) e S21 (*iucA*), também não foram identificados nas amostras transconjugantes. Com isso, sugere-se que estes genes possam estar localizados no cromossomo destas linhagens, bem como os genes de adesão e invasão dessas linhagens. Esta observação pode indicar a presença de possíveis “ilhas de patogenicidade” nestas linhagens, porém outros estudos devem ser realizados para que esta hipótese se confirme. A produção de colicinas (Ia, Ib, E1, E3, B, K) pela linhagem SCI10 também foi

passível de ser transferida para a linhagem bacteriana receptora, o que indica que esta característica é expressa por genes presentes no plasmídio transferido (120 MDa).

Através de testes de invasão na linhagem celular HEp-2, Microscopia Eletrônica de Varredura e teste de FAS verificou-se que a capacidade de invasão celular presente na linhagem S17 é diferente daquelas descritas para outras *E. coli* invasivas, *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.

ABSTRACT

Two pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from avian (APEC) showing clinical signs of septicemia (S17 and S21), and one isolated from avian showing clinical signs of Swollen Head Syndrome (SHS10), were selected from a total of 49 strains belonging to the Laboratory of Bacterial Molecular Biology, after a biological characterization regarding the presence of adhesion and invasion capacities to HEp-2 and HeLa cells, resistance profile to different antimicrobial drugs, presence of genes (detected by PCR) associated with pathogenicity, and plasmidial DNA profile. REP-PCR assay also was performed for separation of these strains in clonal groups. Plasmids from these strains were transferred by conjugation assays to the non-pathogenic *E. coli* strain HB101. The analysis of the obtained recombinant strains, demonstrated that only recombinant strains derived from S17, one of these designated as S17-1, showed adhesion and invasion to these cells, indicating that the genes responsible for these characteristics are located in the transferred plasmid (70 MDa). Since the adhesion and invasion capacities of S21 and SHS10 strains were not detected in recombinant strains where the transference of plasmids presents in these two strains occurred, indicates that the genes responsible for these characteristics are not plasmid-mediated. The location of these genes could be chromosomal, or thus plasmidial, but with chromosomal control. The mutation of S17-1 strain, with TnphoA transposon, resulted in the lost of adhesion and/or invasion capacities to HEp-2 and HeLa cells, which indicate that the transposon insertion process had occur at genes associated with the described process. The *tsh* gene (temperature-sensitive hemagglutinin) from S21 strain, and aerobactin genes from SHS10 (*fepC*) and S21 (*iucA*) strains, also were not found in the recombinant strains. These results suggest that these genes could be located in chromosomal regions as well as the adhesion and invasion genes from these strains. This observation could indicate that the presence of possible “pathogenicity islands” in these strains, but other studies must be realized for confirmation of this hypothesis. The production of colicins (Ia, Ib, E1, E3, B and K) by strain SHS10 also was transferred to the recipient strain, which indicate that this characteristic is expressed by genes located at the transferred plasmid (120 MDa). Using invasion assays to HEp-2 cells, Scanning Electron Microscopy and FAS assay, it was possible to observe that the cellular invasion capacity from S17 strain is different of those processes described by others invasive *E. coli*, *Salmonella* spp. and *Shigella* spp.

1- INTRODUÇÃO

A bactéria

A bactéria *Escherichia coli* é uma representante importante das bactérias anaeróbias facultativas que habitam o intestino (Drasar & Hill, 1974). Este bacilo foi descrito em 1885, pela primeira vez, por Theodor Escherich, que o denominou, inicialmente, de *Bacterium coli*.

A maioria das linhagens de *E. coli* não é patogênica, mas algumas estão associadas a uma variedade de doenças intestinais em humanos (Levine, 1987) e outros animais (Pestana de Castro *et al.*, 1984; Blanco *et al.*, 1993; Robins-Browne *et al.*, 1994).

Da mesma maneira, algumas linhagens de *E. coli* estão associadas a várias infecções extraintestinais humanas tais como pielonefrite (Pechere, 1985), septicemia (Ørskov & Ørskov, 1985) e meningite em recém-nascidos (Overall Jr., 1970). Em outros animais, também podem causar infecções extraintestinais, como infecção do trato urinário (UTI) (Wooley & Blue, 1976; Peeters, 1994) e piometra (Bjurstrom, 1993) em cães, bem como infecções associadas a quadros respiratórios em aves (Levine, 1984).

Nesse sentido, *E. coli* é dentro do grupo de bactérias gram-negativas, o exemplo mais significativo de bactéria relacionada a diversas doenças, pela grande versatilidade de suas linhagens na expressão de diferentes mecanismos de patogenicidade e fatores de virulência frente a diferentes hospedeiros.

Kauffmann (1947) propôs, pela primeira vez, que linhagens de *E. coli* fossem identificadas tendo-se como base seus principais antígenos de superfície. Esses foram denominados de O e H representando, respectivamente, o lipopolissacarídeo (LPS) termoestável da membrana externa da parede de bactérias gram-negativas, e a proteína do flagelo. A esses, também se somam os antígenos capsulares, que foram denominados de antígenos K.

Os sorogrupos O1, O2 e O78 são os mais freqüentemente descritos na literatura internacional como associados à patogenicidade para aves (Sojka & Carnaghan, 1961; Dhomoulin & Fairbrother, 1999), embora um trabalho realizado com linhagens brasileiras indique que linhagens não tipáveis possam apresentar importância epidemiológica (Silveira *et al.* 2002a).

Doenças em Aves causadas por *E. coli*

As infecções causadas por *E. coli* são responsáveis por grandes prejuízos na indústria aviária em todo mundo (Gross, 1991).

As linhagens de *E. coli* patogênicas encontradas em aves, também denominadas “Avian Pathogenic *E. coli*” (APEC) (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999), estão associadas a diversas doenças, principalmente extraintestinais, tais como septicemia, celulite, pericardite, perihepatite, onfalite, peritonite, infecções do trato respiratório e síndrome da cabeça inchada (in: Gyles, 1994).

Uma das mais importantes doenças causadas por APEC é a colisepticemia que, geralmente, inicia-se no trato respiratório seguida a uma infecção viral primária ou por micoplasma (Gross, 1991; Jordan & Pattison, 1996). As infecções do trato respiratório por APEC, consideradas passos iniciais da colisepticemia em aves (Gross, 1991) e, muitas vezes, referidas como doenças dos sacos aéreos, normalmente ocorrem em aves entre 2 e 12 semanas de idade, com as maiores perdas ocorrendo na faixa de 4 a 9 semanas, podendo a mortalidade chegar, nesses casos, a 20% (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

Diversas investigações sobre o entendimento dos possíveis mecanismos de patogenicidade de APEC que causam septicemia têm sido publicadas (Gross 1961; Smith, 1974). Entretanto, os estudos que envolvem fatores de virulência específicos que determinam a septicemia nessas espécies ainda são limitados. Recentemente, determinantes e genes de virulência têm sido caracterizados, como por exemplo, genes que codificam adesinas, toxinas e sistemas de aquisição de ferro (Fantinatti *et al.* 1994; Gyles, 1994; Babai *et al.*, 1997; Janßen *et al.*, 2001; Mellata *et al.*, 2003).

Outra doença causada por linhagens de APEC é a Síndrome da Cabeça Inchada (SCI), uma doença aguda do trato respiratório de aves domésticas, sendo caracterizada por edema gelatinoso da pele facial e tecido periorbital e, em alguns casos, exsudato na bolsa conjuntiva, no tecido subcutâneo facial e nas glândulas lacrimais (Pattison *et al.*, 1989; Nunoya *et al.*, 1991).

A SCI, inicialmente descrita na África do Sul (Morley & Thomson, 1984), tem tido grande importância em diversos países, incluindo o Brasil (Arns & Hafez, 1992). Essa doença tem apresentado prejuízos consideráveis no comércio de aves, atingindo geralmente

mortalidade de 3 a 4% das aves e uma redução de 2 a 3% na produção de ovos (Morley & Thomson, 1984).

Uma terceira doença, também considerada importante é a onfalite, sendo uma infecção caracterizada pela necrose do tecido do cordão umbilical das aves, fazendo com que esses se tornem descoloridos e edematosos. Essa infecção pode se estender à cavidade abdominal ocasionando peritonite e pericardite, e também pode ocorrer no embrião, numa região localizada no saco vitelínico denominada ônfalo (Hoffman, 1968; Burke, 1988).

A celulite é uma dermatite necrótica do abdômen e coxas que geralmente ocorre em aves jovens (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999), não existindo, pelo que sabemos, dados epidemiológicos que corroborem as taxas de morbi-mortalidade para essa doença (Elfadil *et al.*, 1996).

Fatores de virulência

Diversos fatores de virulência têm sido relacionados às linhagens de APEC, como a presença de fímbrias (Gyimah & Panigraphy, 1988; Dozois *et al.*, 1992; Fantinatti *et al.*, 1994; Pourbakhsh *et al.*, 1997; La Ragione *et al.* 2000; Silveira *et al.*, 2002a; Stehling *et al.*, 2003a; Stehling *et al.*, 2003b; Campos *et al.*, 2005), presença de cápsulas (Pourbakhsh *et al.*, 1997), sistema de aerobactina (Dho & Lafont, 1984; Dozois *et al.* 1992), e resistência ao soro (Noolan *et al.*, 1992; Wooley *et al.*, 1992; Wooley *et al.*, 1993; Fantinatti *et al.*, 1994; Ngeleka *et al.*, 1996).

Apesar dos consideráveis avanços no estudo da colibacilose aviária, a patogênese e diversos fatores de virulência presentes nessas linhagens ainda não estão totalmente elucidados (in: La Ragione & Woodward, 2002).

Fímbria do tipo 1

A capacidade de adesão, dessas amostras, no epitélio do trato respiratório, mediada por fatores de colonização, como adesinas (fimbriais ou afimbriais), é importante na patogenicidade da bactéria (Moon, 1990).

Entre as fímbrias mais importantes em APEC, destaca-se a do tipo 1, que está relacionada à capacidade da bactéria em aderir ao epitélio do trato respiratório superior (Wooley *et al.*, 1998). As propriedades adesivas desta fímbria são inibidas por antisoros

específicos e pelo carboidrato D-manose, receptor celular da fímbria, característica utilizada na sua identificação (Gyimah & Panigrahy, 1988).

A fímbria do tipo 1 é codificada pelo “operon” *pil* (Hull *et al.*, 1981), que é composto por um conjunto de pelo menos 8 genes (operon *fim*), sendo o produto de *fimA* o maior componente da fímbria, e o produto de *fimH* conferindo propriedades adesivas à fímbria (Abraham *et al.*, 1988). Os genes *fimF* e *fimG* codificam proteínas auxiliares das subunidades estruturais da fímbria, os genes *fimC* e *fimD* estão envolvidos na reunião das subunidades, enquanto *fimB* e *fimE* determinam a variação de fase fimbrial (Mol & Oudega, 1996).

Marc & Dho-Moulin (1996) identificaram regiões variáveis do gene *fimA* em APEC. Tais regiões, provavelmente, correspondem aos sítios antigênicos que podem estar relacionados aos sorogrupos das linhagens. Essas regiões podem modular a função e especificidade da fímbria do tipo 1. Apesar do gene *fimA* não estar diretamente ligado às propriedades adesivas da fímbria tipo 1, o gene pode estar relacionado à patogenicidade bacteriana por constituir a porção antigênica desta fímbria.

Alguns estudos (Dozois *et al.*, 1992; Wooley *et al.*, 1992) mostraram que essa fímbria apresentava uma maior frequência em linhagens de APEC do que nas linhagens não-patogênicas, sugerindo que esta poderia estar relacionada à patogenicidade das primeiras.

Fímbria P

Outra adesina importante, denominada fímbria P, inicialmente encontrada em amostras de *E. coli* associadas a infecções do trato urinário de humanos (Kallenius *et al.*, 1980), tem sido encontrada também em linhagens de APEC (Achtman *et al.*, 1986; Dozois *et al.*, 1992).

Esta fímbria é codificada por um conjunto de 11 genes cromossômicos denominado “operon” *pap* (Latham & Stamm, 1984). O gene *papA* codifica a subunidade estrutural da fímbria P, e os genes *papI* e *papB* exercem o papel regulatório, responsável pela variação de fase da fímbria. O gene *papE* codifica a extremidade da subunidade fimbrial e o gene *papG* codifica a adesina fibrilar, que se liga ao carboidrato Gal α (1-4) presente nos glicolipídios das células epiteliais do trato urinário, do fígado e de outros tecidos. O gene *papH* é responsável pela ancoragem da fímbria à membrana celular. Os genes *papF* e *papK* codificam proteínas necessárias à integridade da associação conformacional e proteínas que coordenam a reunião

ordenada do complexo fimbrial (Fernández & Bereguer, 2000). E os genes *papC*, *papD* e *papJ* codificam proteínas transportadoras das subunidades estruturais (Lindberg *et al.*, 1989).

Dho-Moulin & Fairbrother (1999) relataram que linhagens de APEC expressaram adesinas da fímbria P, apesar destas adesinas serem observadas em baixa proporção nas linhagens estudadas. Porém, outros estudos (Dozois *et al.*, 1992; Van Den Bosch *et al.*, 1993; Campos *et al.*, 2005) mostraram que seqüências do gene *pap* foram encontradas em alta frequência em linhagens isoladas de aves com quadro clínico de septicemia.

A função da fímbria P na virulência de amostras APEC ainda não está esclarecida, porém, Pourbakhsh *et al.* (1997), através de estudos *in vivo*, verificaram uma certa variação da expressão das fímbrias P de acordo com a sua localização, sugerindo que estas não são importantes na colonização inicial do epitélio do trato respiratório superior, mas sim, nos estágios posteriores da infecção.

Fímbrias “curli”

Outra adesina fimbrial relacionada à adesão de linhagens de APEC é a fímbria “curli”. As fímbrias “curli” são estruturas filamentosas finas e enroladas, que medem aproximadamente 2 nm de diâmetro, encontradas na superfície da *E. coli* e *Salmonella* spp. (Olsen *et al.*, 1989; Collinson *et al.*, 1993). As fímbrias curli são otimamente expressas a 26°C, na fase estacionária de crescimento, e em meios de baixa osmolaridade (Olsen *et al.*, 1993a).

Inicialmente, acreditava-se que essas fímbrias eram codificadas pelo gene *crl* (Olsen *et al.*, 1989), entretanto, estudos subseqüentes demonstraram que o gene *crl* ativava genes críticos para a formação das fímbrias “curli” (Arnqvist *et al.*, 1992). E, mais recentemente, tem sido demonstrado que o gene *csgA* é responsável pela codificação da maior subunidade estrutural da curlina (Olsen *et al.*, 1993b). Atualmente, sabe-se que os genes estruturais (*csgA* e *csgB*) e regulatórios das fímbrias “curli” estão localizados num operon denominado *csgAB* (Hammar *et al.*, 1995). O gene *csgB* é responsável pela estabilização das proteínas curlina e sua organização em estruturas fibrilares, os genes *csgE*, *csgF* e *csgG* estão envolvidos no transporte dos monômeros de curlina, e o gene *csgD* funciona como ativador transcricional dos genes *csgA* e *csgB* (Hammar *et al.*, 1995). Além do gene *crl*, todos os genes envolvidos na

expressão da fímbria “curli” são regulados pelo fator sigma *rpoS* (Olsen *et al.*, 1993b; Hammar *et al.*, 1995).

A função dessas fímbrias ainda não está elucidada. Acredita-se que estas possam estar relacionadas à adesão bacteriana e colonização nos estágios iniciais da infecção (Olsen *et al.*, 1989).

Hemaglutinina termo-sensível (TSH)

Outra adesina, afimbrial, importante na adesão bacteriana, é a proteína “Temperature Sensitive Hemagglutinin” (TSH). Esta proteína, codificada pelo gene *tsh*, está relacionada à atividade de hemaglutinação de eritrócitos de galinhas, sendo preferencialmente expressa a baixas temperaturas (26-30°C) e reprimida a 42°C em linhagens de APEC (Provence & Curtiss III, 1994).

Essa hemaglutinina é uma proteína de 140 KDa que, na forma ativa, apresenta 118 KDa. Esta proteína possui alta homologia às proteases de IgA de *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*, podendo apresentar atividade proteolítica e de hemaglutinação (Stathopoulos *et al.*, 1999).

O gene *tsh*, que codifica essa hemaglutinina, foi localizado, em muitas linhagens de *E. coli*, no plasmídeo ColV, próximo aos genes que codificam para a expressão da colicina V (Provence & Curtiss III, 1994). Entretanto, este gene também foi identificado em plasmídios de virulência e em ilhas de patogenicidade presentes em algumas linhagens patogênicas de enterobactérias (Dozois *et al.*, 2000; Stehling *et al.*, 2003a).

Maurer *et al.* (1998) demonstraram que o gene *tsh* estava presente em 46% de isolados clínicos de *E. coli* de origem aviária, e nenhum dos isolados de animais saudáveis. Em outro estudo, Dho-Moulin *et al.* (1997), analisando 300 aves da França e Quebec, verificaram que a incidência do gene em amostras patogênicas (90,6%) foi maior que em não patogênicas. Campos *et al.* (2005) demonstraram que o gene *tsh* estava presente em 25% e 50%, em isolados de APEC, com septicemia e SCI, respectivamente; enquanto que nas linhagens comensais esse gene estava presente em somente 6% dos isolados. Assim, estes resultados sugerem que a proteína TSH pode estar envolvida no processo de patogenicidade, entretanto a sua função específica ainda não está bem esclarecida.

Aerobactina

O mecanismo de patogenicidade envolvido na aquisição de íons de ferro (Fe^{+2}) do hospedeiro inclui a produção de compostos denominados sideróforos, que atuam como quelantes desses íons do organismo hospedeiro (Williams & Griffiths, 1992). Basicamente, dois tipos de sideróforos são conhecidos: os fenolatos e os hidroxamatos. A aerobactina é um sideróforo do tipo hidroxamato sendo codificado por genes plasmidiais reunidos num operon que, geralmente está presente num plasmídeo de 80 Kb (Gibson & Magrath, 1969; Williams, 1979). Esse sideróforo é muito encontrado em fungos e algumas linhagens de *E. coli* enterovasivas (Water & Crosa, 1991).

A produção de sideróforos é importante para os microrganismos, pois esses utilizam ferro como elemento essencial para sua multiplicação no hospedeiro (Williams & Griffiths, 1992).

Dho & Lafont (1984) observaram uma correlação positiva entre a habilidade de linhagens de APEC crescerem em baixas concentrações de ferro, e a letalidade em pintos de um dia de idade. Alguns estudos (Linggood *et al.*, 1987, Dozois *et al.*, 1992, Emery *et al.*, 1992; Silveira *et al.*, 2002a) demonstraram que a maioria de linhagens de APEC possui e expressa o sistema de aquisição de ferro (aerobactina), enquanto que as linhagens não-patogênicas, apresentam esse sistema em menor frequência.

Recentemente, dois genes, o *fyuA* (“ferric yersiniabactin uptake”) e *irp-2* (“iron repressible protein”), que codificam proteínas envolvidas na aquisição de ferro descritas em *Yersinia* spp. e linhagens de *E. coli* enteroagregativas (EAEC) (Pelludat *et al.*, 1998; Schubert *et al.*, 1998; Karch *et al.*, 1999). Também foram encontrados com alta frequência em linhagens de APEC (Gophna *et al.*, 2001; Janßen *et al.*, 2001). Outros genes, como *iucA* (requerido na síntese de sideróforos) e *fepC* (transporte de sideróforos), também foram encontrados em amostras de *E. coli* (Okeke *et al.*, 2004).

Cápsula

A cápsula é uma estrutura que pode ser encontrada em algumas linhagens de *E. coli*, e que contém em sua composição, o ácido N-acetil murâmico. Esse ácido pode interagir com elementos da via clássica do complemento, induzindo à resistência bacteriana ao sistema imunológico (Jann & Jann, 1997).

O antígeno K1 é freqüentemente associado às linhagens de APEC pertencentes aos sorogrupos O1, O2, e também, em muitas linhagens não-tipáveis (Gross, 1991).

Mais recentemente, Pourbakhsh *et al.* (1997) demonstraram que três linhagens de APEC, que possuíam o antígeno K1, eram mais resistentes aos efeitos bactericidas do soro do que outras três linhagens que apresentavam diferentes antígenos K.

Colicinas

Colicinas são substâncias produzidas por linhagens de *E. coli* com a função de inibir o crescimento de outras linhagens da mesma espécie ou espécies relacionadas. Tais substâncias possuem duas subunidades protéicas. A subunidade maior é responsável pela lesão celular bacteriana, enquanto a menor tem como função a autoproteção contra sua própria colicina (Hardy *et al.*, 1975). Essas colicinas podem ser produzidas a partir da presença de plasmídios colicinogênicos (plasmídios Col), sendo as colicinas Ia, Ib, E1, E2, E3, I, K, B e V, as mais conhecidas (Fantinatti *et al.*, 1994; Silveira *et al.*, 2002a).

Toxinas

Algumas linhagens de *E. coli* são capazes de produzir toxinas, como por exemplo, as enterotoxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST) (Smith & Gyles, 1970), e as verotoxinas, conhecidas, também, como “Shiga-like toxins” (SLT) (O’Brien *et al.*, 1977; O’Brien *et al.*, 1982; Emery *et al.*, 1992; Fantinatti *et al.*, 1994; Blanco *et al.*, 1997; Parreira & Yano, 1998).

Truscott (1973) sugeriu que algumas linhagens de APEC eram capazes de produzir exotoxinas. Emery *et al.* (1992) demonstraram que linhagens de APEC (22,5%) isoladas de aves com quadro clínico de septicemia foram capazes de produzir LT com atividade citotóxica para células Y-1 e Vero. Outros trabalhos, (Fantinatti *et al.*, 1994; Blanco *et al.*, 1997), também demonstraram que, linhagens de APEC isoladas de aves septicêmicas, apresentaram atividade citotóxica. Parreira & Yano (1998) verificaram a produção de toxinas em 72% das 50 linhagens de APEC isoladas de aves com quadro clínico de SCI.

Resistência ao soro

A resistência aos efeitos bactericidas do complemento do soro, mediada por estruturas da superfície bacteriana, tais como cápsula, LPS, produção de ColV e outras proteínas de membrana, tem sido associada às linhagens de APEC, principalmente àquelas isoladas de aves com quadro clínico de septicemia (Gross, 1991; Wooley *et al.*, 1993; Fantinatti *et al.*, 1994; Ngeleka *et al.*, 1996).

Wooley *et al.* (1992) encontraram uma forte associação entre a resistência ao soro e isolados de APEC de galinhas com quadro clínico de septicemia. Noolan *et al.* (1992) demonstraram uma alta correlação entre a resistência ao soro e a letalidade de galinhas com 21 dias de idade. Fantinatti *et al.* (1994) demonstraram que essa resistência ao soro do hospedeiro era codificada por genes plasmidiais.

Outros fatores

Outros fatores de virulência relacionados a determinadas ilhas de patogenicidade têm sido relatados em linhagens de APEC (Parreira & Gyles, 2003), além da presença do “Locus of Enterocyte Effacement (LEE)” que codifica proteínas associadas a uma lesão conhecida como “Attaching and Effacing” (A/E) (Foster *et al.*, 1998; Pennycott *et al.*, 1998; La Ragione *et al.*, 2002).

A habilidade de linhagens de APEC em se ligar ao corante Vermelho de Congo em meio ágar, tem sido observada. Alguns autores têm proposto utilizar essa característica como um marcador de virulência dessas linhagens (Berkhoff & Vinal, 1986; Cobertt *et al.*, 1987).

Caracterização genética

Muitos métodos genotípicos têm sido utilizados na caracterização bacteriana. As técnicas mais utilizadas atualmente são: Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP) (Liu *et al.*, 1995), Eletroforese de campo pulsado (Brian *et al.*, 1993), Ribotipagem (Cavé *et al.*, 1994) e Análise da Amplificação Randômica do DNA Polimórfico (RAPD) (Pacheco *et al.*, 1998), além da metodologia clássica envolvendo isoenzimas (Blom-Potar *et al.*, 1989).

Recentemente, outros métodos de tipagem molecular baseados na análise de seqüências cromossômicas repetitivas, como o “Repetitive Extragenic Palindromic” (REP) e

“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” (ERIC), têm sido utilizado para caracterização clonal de diferentes espécies de *Enterobacteriaceae*. A distribuição dispersa destes elementos repetitivos de DNA no genoma de vários microorganismos, utilizando iniciadores conservados, pode ser testada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Hulton *et al.*, 1991; Versalovic *et al.*, 1991).

Alguns estudos demonstraram que as técnicas de REP-PCR e ERIC-PCR foram eficientes na discriminação de clones de amostras de *E. coli* de origens humanas e outros animais, assim também, como na comparação entre estas (Dalla-Costa *et al.*, 1998; Osek, 2000). Além disso, estas técnicas, são testes relativamente mais fáceis e rápidos de serem realizados, quando comparados a outras técnicas moleculares como o RFLP.

Recentemente, nossos estudos demonstraram que a técnica de ERIC-PCR e a análise do perfil de Isoenzimas foram eficientes para discriminar linhagens de APEC de linhagens comensais, como também para observar o agrupamento (“clusters”) de linhagens causadoras do mesmo tipo de doença (Silveira *et al.*, 2002b; Silveira *et al.*, 2003).

Uma das propostas desse estudo é avaliarmos se a técnica de REP-PCR também possa ser utilizada para o estudo da estrutura clonal populacional dessas linhagens, e, conseqüentemente, servir de parâmetro para futuros estudos dos mecanismos de patogenicidade das linhagens de APEC.

2- OBJETIVOS

O presente estudo determinou a características biológicas e genéticas, de linhagens de APEC isoladas de aves com sinais clínicos de septicemia, SCI e onfalite, relacionadas à patogenicidade e também à presença de plasmídios. Além disso, um estudo de caracterização ou variabilidade clonal foi realizado para essas linhagens de APEC.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Linhagens bacterianas

Nesse estudo, inicialmente foram estudadas 49 linhagens de APEC causadoras de diferentes doenças em aves (24 isoladas de aves com quadro clínico de septicemia, 14 isoladas de aves com quadro clínico de síndrome da cabeça inchada e 11 isoladas de aves com quadro clínico de onfalite) (Campos *et al.*, 2005). Nessas linhagens foi determinado o perfil clonal através da técnica de REP-PCR, sendo as mesmas, a seguir, estudadas quanto ao perfil de resistência bacteriana e presença de fatores de virulência (adesão e/ou invasão em culturas celulares, genes de virulência, colicinas e outros). Como controle foram utilizadas 30 linhagens de *E. coli* isoladas a partir da cloaca de aves que não apresentavam qualquer sinal das doenças acima (linhagens denominadas normais).

A relação das linhagens de APEC encontra-se na tabela a seguir:

Tabela I: Linhagens iniciais de APEC e normais utilizadas no estudo e suas respectivas resistências a antimicrobianos.

Linhagem	Origem	Resistência a antimicrobianos	Linhagem	Origem	Resistência a antimicrobianos
N1	Microbiota de aves sadias	Tc, AN	S11	Aves septicêmicas	S
N2	Microbiota de aves sadias	S	S12	Aves septicêmicas	Cm
N3	Microbiota de aves sadias	S	S13	Aves septicêmicas	Ap, Sm
N4	Microbiota de aves sadias	S	S14	Aves septicêmicas	S
N5	Microbiota de aves sadias	Tc, AN	S15	Aves septicêmicas	S
N6	Microbiota de aves sadias	Tc	S16	Aves septicêmicas	Km
N7	Microbiota de aves sadias	Tc	S17	Aves septicêmicas	Tc
N8	Microbiota de aves sadias	S	S18	Aves septicêmicas	Tc
N9	Microbiota de aves sadias	Tc, AN, Ap	S19	Aves septicêmicas	Tc, Km, Gen
N10	Microbiota de aves sadias	Tc, AN	S20	Aves septicêmicas	S
N11	Microbiota de aves sadias	AN, Cm	S21	Aves septicêmicas	Tc
N12	Microbiota de aves sadias	S	S22	Aves septicêmicas	S
N13	Microbiota de aves sadias	S	S23	Aves septicêmicas	Ap, Cm, Km, Tc, AN
N14	Microbiota de aves sadias	S	S24	Aves septicêmicas	S
N15	Microbiota de aves sadias	Tc, AN	SCI1	Aves com Síndrome da cabeça inchada	Tc, Sm, Gen
N16	Microbiota de aves sadias	S	SCI2	Aves com Síndrome da cabeça inchada	Tc, Sm, Gen
N17	Microbiota de aves sadias	Tc, AN	SCI3	Aves com Síndrome da cabeça inchada	Tc, Sm, Gen
N18	Microbiota de aves sadias	Tc, AN	SCI4	Aves com Síndrome da cabeça inchada	Tc, Sm, Gen
N19	Microbiota de aves sadias	Tc	SCI6	Aves com Síndrome da cabeça inchada	S
N20	Microbiota de aves sadias	S	SCI7	Aves com Síndrome da cabeça inchada	Tc, Sm, Gen
N21	Microbiota de aves sadias	Ap	SCI8	Aves com Síndrome da cabeça inchada	Sm, Gen
N22	Microbiota de aves sadias	Km, Cm, Tc	SCI9	Aves com Síndrome da cabeça inchada	Gen
N23	Microbiota de aves sadias	S	SCI10	Aves com Síndrome da cabeça inchada	Tc, Km
N24	Microbiota de aves sadias	AN, Tc, Cm, Km	SCI11	Aves com Síndrome da cabeça inchada	S
N25	Microbiota de aves sadias	S	SCI12	Aves com Síndrome da cabeça inchada	S
N26	Microbiota de aves sadias	Tc, AN	SCI13	Aves com Síndrome da cabeça inchada	S
N27	Microbiota de aves sadias	Tc	SCI14	Aves com Síndrome da cabeça inchada	S
N28	Microbiota de aves sadias	S	SCI15	Aves com Síndrome da cabeça inchada	S
N29	Microbiota de aves sadias	Sm, AN, Km, Tc	O1	Aves com onfalite	S
N30	Microbiota de aves sadias	S	O2	Aves com onfalite	S
S1	Aves septicêmicas	S	O3	Aves com onfalite	S
S2	Aves septicêmicas	S	O4	Aves com onfalite	S
S3	Aves septicêmicas	Cm	O5	Aves com onfalite	S
S4	Aves septicêmicas	Tc	O6	Aves com onfalite	Tc
S5	Aves septicêmicas	S	O7	Aves com onfalite	Ap
S6	Aves septicêmicas	Tc	O8	Aves com onfalite	Ap, Sm, AN
S7	Aves septicêmicas	Cm	O9	Aves com onfalite	S
S8	Aves septicêmicas	S	O10	Aves com onfalite	Ap, Tc, AN
S9	Aves septicêmicas	Tc, Ap	O11	Aves com onfalite	Ap, Tc, Sm
S10	Aves septicêmicas	Cm, Gen			

Observações: S: sensibilidade a todos antimicrobianos testados. Tc: Tetraciclina. Ap: Ampicilina. Cm: Cloranfenicol. Km: Kanamicina. Sm: Estreptomicina. Gen: Gentamicina. AN: Ácido Nalidíxico.

3.2- Linhagens controles

As linhagens utilizadas como controles nesse estudo encontram-se na tabela abaixo.

Tabela II: Linhagens utilizadas no estudo como controles.

LINHAGENS	CARACTERÍSTICA	ORIGEM
<i>E. coli</i> V517	Contém 8 plasmídios entre 1,25 e 32,4 MDa	Cedida por Dr. J. B. Kaper (USA)
<i>E. coli</i> J53	Plasmídio pRA1 de 86 MDa	Cedida por Dr. J. B. Kaper (USA)
<i>E. coli</i> J53-1	Plasmídio pR40a de 96 MDa	Cedida por Dr. J. B. Kaper (USA)
<i>E. coli</i> 22R80	K12 sensível a todas colicinas	UFMG ¹
<i>E. coli</i> 22R81	K12 sensível à colicina I	UFMG ¹
<i>E. coli</i> 22R82	K12 sensível à colicina Ia	UFMG ¹
<i>E. coli</i> 22R83	K12 sensível à colicina Ib	UFMG ¹
<i>E. coli</i> 22R675	K12 sensível à colicina E1	UFMG ¹
<i>E. coli</i> 22R676	K12 sensível à colicina E3	UFMG ¹
<i>E. coli</i> 22R914	K12 sensível à colicina ROW-K	UFMG ¹
<i>E. coli</i> 22R915	K12 sensível à colicina V	UFMG ¹
<i>E. coli</i> 22R996	K12 sensível à colicina B	UFMG ¹
<i>E. coli</i> E2348/69	Adesão localizada em HeLa e HEp-2 e controle positivo para o teste de FAS ⁵	Instituto Butantan ²
<i>E. coli</i> TR 302/4	Adesão difusa em HeLa e HEp-2	Instituto Butantan ²
<i>E. coli</i> O431-1	Adesão agregativa em HeLa e HEp-2	Instituto Butantan ²
<i>E. coli</i> O124 (EIEC)	Invasão em HeLa e HEp-2 e controle positivo para genes <i>ial</i> e <i>iha</i>	UNICAMP ⁴
<i>E. coli</i> K12 (HB101)	Adesão negativa	Boyer & Roulland-Dussoix (1969)
<i>E. coli</i> SM10	Plasmídio pRT733 (TnphoA)	Taylor <i>et al.</i> (1989)
<i>E. coli</i> O42	Controle positivo para os genes <i>iucA</i> e <i>fepC</i>	UNIFESP ³
<i>E. coli</i> 17-2	Controle positivo para os genes <i>fyuA</i> e <i>irp-2</i>	Instituto Butantan ²
<i>E. coli</i> O157:H7	Controle positivo para os genes <i>lpfA</i> _{O157/OI-141} , <i>lpfA</i> _{O157/OI-154} , <i>toxB</i> , <i>efa</i> e <i>chuA</i>	UNICAMP ⁴
<i>Shigella flexneri</i>	Controle positivo para o gene <i>sitA</i>	UNICAMP ⁴
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Controle positivo para o gene <i>inv</i>	UNICAMP ⁴
<i>Salmonella typhimurium</i>	Controle positivo para o gene <i>invA/invE</i>	UNICAMP ⁴
APEC (Campos <i>et al.</i> , 2005)	Controle positivo para os genes <i>fimA</i> , <i>papA</i> , <i>csgA</i> , <i>crl</i> , <i>afa</i> , <i>sfa</i> e <i>tsh</i>	UNICAMP ⁴
APEC	Controle positivo para o gene <i>ibeA</i>	UNICAMP ⁴

1- Linhagem fornecida pelo Prof. Dr. Edmar Chartone de Souza – UFMG.

2- Linhagem fornecida pelo Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Jr. - Instituto Butantan, SP.

3- Linhagem fornecida pela Profa. Dra. Tânia A. Tardelli Gomes do Amaral – UNIFESP.

4- Linhagem do Depto. de Microbiologia e Imunologia - IB – UNICAMP.

5- FAS: “Fluorescence Actin Staining”.

3.3- Meios de Cultura

3.3.1- Luria Bertani (LB) (Miller, 1972)

Triptona	10 g
Cloreto de sódio	10 g
Extrato de levedura	5 g
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000 ml

Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos.

3.3.2- Luria Bertani – Ágar (LA)

Para o preparo do meio LA foram adicionados 1,5 g de ágar bacteriológico (Difco®) para cada 100 ml de meio LB. Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos.

3.3.3- Meio Minca - Ágar

Base

K ₂ HPO ₄	1,36 g
NaHPO ₄ . 2 H ₂ O	10,10 g
Casaminoácidos.....	1,00 g
Extrato de levedura.....	1,50 g
Glicose.....	1,00 g
Ágar.....	20,00 g
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000,00 ml

Sais

MgSO ₄ . 7 H ₂ O.....	10,000 g
MnCl ₂ . 2 H ₂ O	1,000 g
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	0,135 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O.....	0,400 g
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000,000 ml

A solução de sais foi esterilizada por filtração (filtros de 0,22 µm, Millipore®) e sendo 1 ml dessa solução adicionada ao meio base esterilizado.

3.3.4- Meio Ágar Sangue

Base

Peptona	5 g
Cloreto de sódio	8 g
Extrato de carne	3 g
Ágar bacteriológico	15 g
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000 ml

Sangue desfibrinado de carneiro foi adicionado ao meio base esterilizado para uma concentração final de 0,5%.

3.3.5- Meio “Trypticase Soy Agar” (TSA)

Ágar Bacteriológico	15 g
TSB	50 g
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000 ml

Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos.

3.3.6- Meio ágar Mac Conkey

O meio de cultura utilizado foi o da formulação fornecida pela Oxoid ®.

3.3.7- Meio “Brain Heart Infusion” (BHI) - Ágar

O meio de cultura utilizado foi o da formulação fornecida pela Oxoid ®, com a adição de 2% de ágar bacteriológico.

3.3.8- Meio Eagle

O meio de cultura Eagle utilizado foi o da formulação fornecida pela Nutricell ® .

3.3.8- HOGNESS (estoque)

K ₂ HPO ₄	6,30 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O . 2H ₂ O	0,45 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,09 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,90 g
KH ₂ PO ₄	1,80 g
Glicerol	44,00 ml
Água destilada/deionizada q.s.p.	100,00 ml

Após o preparo, a solução foi esterilizada, sob vapor fluente, durante 30 minutos. Para estocagem das amostras bacterianas (- 70°C), foram adicionados 400 µl de solução de Hogness a 400 µl de meio LB contendo a amostra.

3.4- Soluções

3.4.1- Extração Plasmidial

SOLUÇÃO I

Tampão Tris-HCl 1 M pH 8,0	0,25 ml
Solução EDTA 0,5 M pH 8,0	0,20 ml
Glicose 0,5 M	1,00 ml
Lisozima	0,04 g
Água destilada/deionizada q.s.p.	10,00 ml

SOLUÇÃO II

NaOH 10 N	0,2 ml
SDS 10%	1,0 ml
Água destilada/deionizada q.s.p.	10,0 ml

SOLUÇÃO III

Acetato de sódio 5 M	60,0 ml
Ácido Acético Glacial	11,5 ml
Água destilada/deionizada q.s.p.	28,5 ml

3.4.2 – Soluções utilizadas na extração de DNA genômico

Solução de lise

Tampão Tris-HCl 1 M pH 8,0	2,0 ml
Solução EDTA 0,5 M pH 8,0	0,2 ml
NaCl 5 M	0,2 ml
Proteinase K	10 mg
SDS 10%	5,0 ml
Água destilada/deionizada q.s.p.	100,00 ml

Após o preparo, a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

Fenol: Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1)

Fenol	25 ml
Clorofórmio	24 ml
Álcool Isoamílico	1 ml

Tampão Tris-EDTA pH 8,0 (TE)

Para o preparo do tampão Tris-EDTA, o tampão Tris-HCl (pH 8,0) foi utilizado para uma concentração final de 10 mM, e o EDTA de 1 mM.

3.4.3 – Soluções utilizadas na eletroforese e visualização em gel de agarose

Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X

Tris-base	54,0 g
Ácido bórico	27,5 g
Solução de EDTA 0,5 M	20,0 ml
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000,0 ml

Após o preparo a solução foi armazenada a 4°C.

Solução corante de brometo de etídio (0,5 µg/ml)

Brometo de etídio 1%	0,05 ml
Água destilada/deionizada q.s.p.	100,00 ml

Tampão de Ressuspensão de DNA

Os corantes azul de bromofenol e xileno cianol foram adicionados à concentração final de 0,25%, para cada um dos corantes, a uma solução de sacarose 50%. Após o preparo, a solução foi armazenada a 4°C.

3.4.4 – Soluções utilizadas no teste de adesão

Tampão Salina Fosfatada (PBS) 0,01 M

Cloreto de sódio	8,00 g
KCl	0,20 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	2,89 g
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000,00 ml

Os sais foram diluídos em 10% a menos do volume final, com exceção do KH₂PO₄, o qual foi diluído separadamente e utilizado no ajuste do pH da solução para 7,4. Em seguida, a solução final foi esterilizada, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos, e armazenada a 4°C até a sua utilização.

Solução de ATV (Associação Tripsina-Versene)

A solução utilizada foi o da formulação fornecida pela Nutricell ®.

Solução Penicilina –Estreptomicina

Penicilina G Potássica	60.000.000 U
Estreptomicina	60 g
Hanks 1x esterilizado	6000 ml

Solução de SØRENSEN

Solução A

KH_2PO_4	9,08 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	11,87 g
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000,00 ml

Solução B

Na_2HPO_4	9,47 g
Água destilada/deionizada q.s.p.	1000,00 ml

Após o preparo das soluções, foram misturadas 23,2 ml da solução A com 76,8 ml da solução B (pH 7,3). Em seguida, a mistura foi esterilizada, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos, e armazenada a 4°C até a sua utilização.

Corante GIEMSA

Giemsa	1 g
Metanol	66 ml
Glicerina	66 ml

A glicerina foi adicionada ao corante e a solução foi mantida a 60°C, em banho-maria, por 90 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados os 66 ml de metanol. Esta solução foi diluída 1:5 em tampão de SØRENSEN, filtrada em papel de filtro e armazenada em frasco escuro a 4°C.

Corante de MAY-GRUNWALD

May-Grunwald 2 g
Metanol 100 ml

A solução foi mantida a 60°C, em banho-maria, durante 30 minutos. Após o resfriamento a solução foi diluída 1:2 em tampão de SØRENSEN, filtrada em papel de filtro e armazenada em frasco escuro a 4°C.

3.4.5 – Soluções utilizadas na extração de proteínas de superfície

Salina

Cloreto de sódio 8 g
Água destilada/deionizada q.s.p. 1000 ml

A solução foi esterilizada, em autoclave, a 121°C durante 20 minutos, e armazenada a 4°C até a sua utilização.

Solução de lavagem

Etanol 500 ml
Éter etílico 500 ml

Tampão de ressuspensão de proteínas

A solução utilizada foi a da formulação fornecida pela Sigma ®.

3.4.6 - Soluções utilizadas na coloração do gel de Poliacrilamida

Solução de Tiosulfato de sódio

Tiosulfato de sódio.....	0,02 g
Água destilada/deionizada q.s.p.	100,00 ml

Solução de Impregnação

Nitrato de Prata.	0,2 g
Formaldeído a 37%.....	75,0 µl
Água destilada/deionizada q.s.p.	100,0 ml

Solução de Revelação

Carbonato de sódio.....	6,0 g
Tiosulfato de sódio 0,02%.....	2,0 ml
Formaldeído a 37%.....	50,0 µl
Água destilada/deionizada q.s.p.	100,0 ml

3.4.7 – Soluções utilizadas na Microscopia Eletrônica de Transmissão

Solução de ácido fosfotungístico (PTA) 1%

Ácido fosfotungístico	1 g
Água destilada/deionizada q.s.p. esterilizada	100 ml

Após o preparo, a solução foi armazenada em frasco escuro a 4°C

Solução de Formvar

Formvar	0,40 g
Clorofórmio	10,00 ml

A solução foi preparada em ambiente isento de umidade, e armazenada à temperatura ambiente.

3.5- Géis

3.5.1- Gel de Poliacrilamida a 12,5%

Separação

Solução de Acrilamida 30% - bisacrilamida 2,7%	12,50 ml
Tris HCl pH 8,8.....	7,50 ml
SDS 10%.....	300,00 µl
Água destilada/deionizada	9,55 ml
Persulfato de amônio 10%	150,00 µl
TEMED.....	10,00 µl

Empacotamento

Solução de Acrilamida 30%	1,33 ml
Tris HCl pH 8,8.....	2,50 ml
SDS 10%	100,00 µl
Água destilada/deionizada	6,10 ml
Persulfato de amônio 10%.....	50,00 µl
TEMED.....	5,00 µl

3.6- Métodos

3.6.1- Preservação das amostras bacterianas

As linhagens foram crescidas em meio LB contendo antimicrobianos específicos. Após incubação de 18-24 horas a 37°C, 400 µl deste meio com bactérias foram transferidos para um microtubo de congelamento de 1,5 ml. Foram adicionados mais 400 µl de solução de Hogness, o frasco agitado em “vortex”, e a suspensão armazenada em freezer a - 70°C.

3.6.2- Seleção das linhagens de APEC a serem estudadas

A seleção de linhagens de APEC a serem estudadas foi feita com base em seu perfil de resistência a antimicrobianos (facilidade na obtenção de recombinantes com a linhagem receptora) e DL 50% (Fantinatti *et al.*, 1994) em pintos de um dia de idade.

3.6.2.1- REP-PCR

3.6.2.1.1- Iniciadores

Os iniciadores REP-PCR recomendados por VERSALOVIC *et al.* (1991) foram os seguintes:

REP1R-I 5`-IIIICGICATCIGGC-3`

REP2-I 5`-ICGICTTATCIGGCCTA-3`

3.6.2.1.2- Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada através do uso de “Kits” comerciais adquiridos da Promega (Kit Wizard® Genomic DNA Purification). O DNA foi quantificado através do espectrofotômetro Gene Quant II (Pharmacia Biotech®), nas leituras 260 e 280 nm e mantido, como estoque, a - 20°C.

3.6.2.1.3- Reação de REP- PCR

As reações de REP-PCR foram realizadas em tubos de 200 µl com volume final de 50 µl. As quantidades dos reagentes empregados, neste teste, encontram-se na tabela abaixo.

Tabela III- Concentração dos reagentes do teste REP-PCR.

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x "PCR buffer"	5 µl	1x
10mM "dNTP mixture"	1 µl	0,2 mM cada
50mM MgCl ₂	1 µl	2 mM
Iniciadores (50 pmol/µl)	1 – 1,0 µl 2 – 1,0 µl	50 pmol cada
DNA molde (50 ng/µl)	2 µl	100 ng
"Taq DNA polimerase" (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
H ₂ O deionizada estéril	38,5 µl	
TOTAL	50µl	

A mistura foi, inicialmente, submetida a 94°C, por 7 minutos, seguindo-se 30 ciclos térmicos nas seguintes temperaturas: 94°C por 30 segundos, 40°C por 1 minuto e 72°C por 8 minutos; para uma completa extensão dos produtos amplificados foi adicionado um passo final de 15 minutos a 72°C.

Para a observação do produto amplificado, foi utilizada eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TBE. Cada corrida eletroforética continha um marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder ou 1 Kb DNA Ladder plus - Invitrogen®). Após a corrida, os géis foram corados com solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml), observados em transiluminador de raios Ultra-Violeta (UV), e fotodocumentados. As reações foram realizadas em duplicatas. No caso de ampliações diferentes na mesma duplicata, houve a repetição, também em duplicata, da reação referida.

3.6.2.1.4- Análise dos dados

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa POPGENE (Versão 1.31) (Yeh *et al.* 1999).

3.6.3- Caracterização das linhagens selvagens e da HB101

3.6.3.1- Determinação do nível de resistência antimicrobiana

A determinação do nível de resistência aos antimicrobianos foi realizada como descrito por Fantinatti *et al.* (1994).

Para a determinação do nível de resistência às drogas nas linhagens bacterianas, foram utilizados os seguintes antimicrobianos: Tetraciclina (Tc), Ampicilina (Ap), Cloranfenicol (Cm), Gentamicina (Gen), Estreptomicina (Sm), Kanamicina (Km) e Ácido Nalidíxico (NA). As amostras bacterianas foram inoculadas em 4 ml de meio LB e incubadas a 37°C por 18 horas e, a seguir, inoculadas, com auxílio de uma alça ou ponteira, em uma série de placas de Petri contendo o meio LA contendo diferentes concentrações de antimicrobianos: (5, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/ml). As placas foram invertidas e incubadas a 37°C por 18 horas. Após a incubação foi verificada a presença ou ausência de crescimento bacteriano nas placas. Considerou-se o nível de resistência, de uma determinada linhagem bacteriana, como sendo a concentração máxima do antimicrobiano na qual a referida linhagem ainda apresentou crescimento.

3.6.3.2- Determinação da produção de colicinas

A produção de colicinas pelas diferentes linhagens bacterianas seguiu a metodologia descrita por Azevedo & Da Costa (1973). As linhagens selvagens, a receptora HB101, as transconjugantes e mutantes, foram inoculadas, com auxílio de uma multi-alça, em placas de Petri contendo meio LA, a partir de um pré-inóculo em tubo com 4 ml de meio LB crescidos a 37°C por 12-18 horas. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C por 18 horas. Após a incubação, nas tampas das placas foram colocados 3 ml de clorofórmio e essas foram mantidas fechadas, e invertidas, por 30 minutos. Após este período de tempo, as placas foram abertas dentro de uma estufa a 37°C por cerca de uma hora para que todo o resíduo de clorofórmio evaporasse. Um volume de 100 µl de cada cultura bacteriana indicadora (tabela II), crescida a partir de um pré-inóculo em meio LB, foi misturado com 4 ml de meio LB semi-sólido e, estes, vertidos sobre as placas que foram incubadas a 37°C por 18 horas. A formação de um halo de inibição do crescimento da colônia indicadora ao redor da colônia a ser testada indicou a produção de colicinas.

3.6.3.3- Determinação do perfil plasmidial

Para a determinação do perfil plasmidial das linhagens bacterianas, o DNA plasmidial foi extraído e submetido a condições de corrida eletroforética como descrito por Sambrook *et al.* (1989). A extração foi realizada de duas formas diferentes: em pequena escala e em larga escala (plasmídios com baixo poder replicativo).

3.6.3.3.1- Extração plasmidial em pequena escala

O método utilizado para extração de DNA plasmidial baseou-se na técnica de lise alcalina de Birboim & Doli (1979). As linhagens bacterianas foram inoculadas em meio LB contendo antibióticos específicos e incubadas a 37°C por 12-18 horas. A seguir, 1ml do cultivo bacteriano foi transferido para um tubo tipo “eppendorff” e centrifugado a 12000 g por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento ressuspenso em 100 µl de solução I gelada e mantido em banho de gelo por 5 minutos. A seguir, 200 µl da solução II foram adicionados e o conteúdo misturado por inversão suave sendo, a seguir, deixado em banho de gelo por cerca de 2 a 3 minutos. Após esse tempo, 150 µl da solução III foram adicionados ao conteúdo do mesmo, e novamente invertidos suavemente e mantidos em banho de gelo por tempo mínimo de 15 minutos. A suspensão foi centrifugada a 12000 g por 4 minutos, sendo 400 µl do sobrenadante transferidos para outro tubo tipo “eppendorff”. A esse volume, foram adicionados 2,5 volumes (1,0 ml) de etanol absoluto gelado (- 20°C), sendo o tubo invertido suavemente para mistura dos conteúdos e, então, mantidos a - 20°C por tempo mínimo de 30 minutos. O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação a 12000 g por 4 minutos, ressuspenso em 20 µl de água deionizada esterilizada, e mantido a - 20°C.

Para a corrida eletroforética, 10 µl do material extraído foram misturados com 3 µl de tampão de ressuspensão de DNA, e a mistura aplicada em gel de agarose a 0,8%. O gel foi corado com brometo de etídio e bandas de DNA foram visualizadas através de um transiluminador de UV. Para fins de registro, o gel foi fotografado.

3.6.3.3.2- Extração plasmidial em larga escala

O método utilizado para extração de DNA plasmidial em larga escala baseou-se na técnica descrita por Sambrook *et al.* (1989). As linhagens bacterianas foram inoculadas em 50 ml de meio LB e incubadas a 37°C por 12-18 horas, sob agitação. A seguir, o crescimento bacteriano foi transferido para tubos de centrifuga e esses submetidos à centrifugação a 5000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuscitado em 5 ml de solução I gelada (contendo 10 mg/ml de lisozima) e mantido em banho de gelo por 30 minutos. A seguir, 10 ml da solução II foram adicionados e o conteúdo misturado, por inversão suave, e deixado em banho de gelo por cerca de 5 minutos. Após esse tempo, 7,5 ml da solução III foram acrescentados ao conteúdo do mesmo e os tubos invertidos suavemente e mantidos em banho de gelo por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada a 14000 g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo. A este volume, adicionaram-se 0,6 volumes de isopropanol gelado (- 20°C) e os tubos invertidos suavemente para mistura dos conteúdos e estes mantidos a - 20°C por 30 minutos. O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação a 14000 g por 10 minutos, ressuscitado em 100 µl de tampão TE (pH 8,0) e mantido a - 20°C. A corrida eletroforética e visualização do DNA plasmidial foram realizadas da mesma forma que a extração em pequena escala.

3.6.3.4 – Teste de adesão em células HEp-2 e HeLa

3.6.3.4.1- Preparo das linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas neste estudo, bem como as linhagens controles, foram semeadas em caldo simples e incubadas por 18 horas a 37°C.

3.6.3.4.2- Preparo das células HEp-2 e HeLa

A metodologia utilizada foi a descrita por Scaletsky *et al.* (1984), com modificações. As células foram cultivadas em microplacas (Falcon, USA) com 24 orifícios em atmosfera de CO₂, contendo 1 ml de meio Eagle acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de antimicrobianos (50% penicilina e 50% estreptomicina). As estas microplacas, previamente, foram colocadas em cada orifício, lamínulas redondas esterilizadas de 13 mm de diâmetro. O crescimento das monocamadas foi acompanhado pela observação após 24-48 horas em

microscópio invertido. A cultura foi considerada ideal para o teste quando as células apresentavam cerca de 50%, ou mais, de confluência da monocamada, e apresentavam baixa refrigência, sem deslocamento.

3.6.3.4.3- Adesão

Após a formação da monocamada celular, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS esterilizado e em cada orifício foi adicionado 1,0 ml de Eagle contendo 2% de soro fetal bovino. Em seguida, cada linhagem bacteriana, crescida por 18 horas em caldo simples, foi adicionada a cada orifício na quantidade de 40 µl. A microplaca foi incubada por 3 e 6 horas a 37°C e , após este período, lavada 10 vezes com 1 ml de PBS 0,01 M (pH 7,4), por orifício. As lamínulas foram fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com May-Grünwald (10 minutos) e Giemsa (10 minutos). Após a coloração, estas foram observadas em microscópio óptico. O teste de adesão foi realizado de duas formas: em presença de D-manose (1%) e em ausência de D-manose.

3.6.3.5 – Teste de invasão em células HeLa e HEp-2

3.6.3.5.1- Teste em lamínulas de 13 mm (microscópico óptico comum)

O ensaio da invasibilidade em células cultivadas “*in vitro*” foi realizado como descrito por Benjamin *et al.* (1995), com modificações. As células foram cultivadas da mesma forma que a realizada no teste de adesão. A seguir, um volume de 50 µl de cada suspensão bacteriana foi adicionado aos orifícios contendo 1 ml de meio Eagle com 10% de SFB e as placas incubadas a 37°C por 90 minutos. Após esse período, o meio de cultura foi descartado e as células lavadas 10 vezes com PBS 0,01 M (pH 7,4) adicionado de antimicrobiano (determinado segundo o perfil de resistência realizado para cada linhagem). Em seguida, foi adicionado 1 ml de meio, também adicionado com antimicrobianos (gentamicina na concentração de 50 µg/ml), em cada orifício e as placas incubadas a 37°C por uma hora. Após este período, o meio de cultura foi descartado, as células lavadas três vezes com PBS (pH 7,4) e as lamínulas fixadas com metanol durante 10 minutos sendo, a seguir, coradas com o corante May Grünwald (10 minutos) e com o corante Giemsa (10 minutos). As lamínulas foram

lavadas com água deionizada esterilizada e montadas com Enthellan sobre lâminas de microscopia óptica. A invasão foi visualizada em microscópio óptico sob aumento de 1000X. As bactérias invasoras foram identificadas através da presença da formação de um halo em torno da bactéria, no interior do citoplasma das células epiteliais.

3.6.3.5.2- Teste de invasão utilizando placas de petri com meios seletivos (contagem de colônias)

Essa técnica de invasibilidade foi realizada como descrito por Sansonetti *et al.* (1986), com algumas modificações. As células foram cultivadas como descrito anteriormente, porém as microplacas com 24 orifícios não apresentaram lamínulas, e para cada orifício foram adicionadas aproximadamente 10^7 bactérias (escala de Mac Farland) diluídas em caldo LB. O tempo de incubação foi o mesmo descrito no teste anterior (90 minutos). Após esse período, o meio de cultura foi descartado e as células lavadas 10 vezes com PBS 0,01 M (pH 7,4). Em seguida, foi adicionado 1 ml de meio, também adicionado com antimicrobianos (gentamicina na concentração final de 50 µg/ml), em cada orifício e as placas incubadas a 37°C por uma hora. Em seguida o tapete celular foi lavado novamente (3 vezes), e para o descolamento e lise do tapete foi adicionado 0,5 ml de deoxicolato de sódio na concentração de 0,5%. Após o descolamento, diluições seriada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram realizadas, e 100 µl de cada diluição foram adicionados em placas de Mac Conkey. Após o período de incubação de 18 horas a 37°C, colônias foram contadas e comparadas com as linhagens controles.

3.6.3.6- Reação em cadeia da polimerase

Todas as linhagens estudadas foram testadas com iniciadores específicos para os genes descritos na tabela IV.

Tabela IV- Iniciadores utilizados no estudo (descrição, seqüência, temperatura de anelamento, tamanho do fragmento amplificado e referência de cada iniciador).

Gene	Descrição	Seqüência (5' – 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Fragmento (bp)	Referência
<i>fimA</i>	Fímbria do tipo 1 (estrutural)	GTTGATCAAACCGTTCAG AATAACGCGCCTGGAACG	50	331	Marc & Dho-Moulin (1996)
<i>tsh</i>	Proteína Tsh	GGGAATGACCTGAATGCTGG CCGCTCATCAGTCAGTACCAC	61	420	Maurer <i>et al.</i> (1998)
<i>papA</i>	Fímbria P (estrutural)	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGATGCAATA	65	328	Le Bouguenec <i>et al.</i> (1997)
<i>csgA</i>	Fímbria “curli” (estrutural)	ACTCTGACTTGAATATTACC AGATGCAGTTCTGGTCAAC	52	200	Maurer <i>et al.</i> (1998)
<i>crl</i>	Fímbria “curli” (regulador)	TTTCGATTGTCTGGCTGTTG CTTCAGATTTCAGCGTCGTC	54	250	Maurer <i>et al.</i> (1998)
<i>afa</i>	Adesina afimbrial (operon)	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	55	710	Blanco <i>et al.</i> (1997)
<i>sfa</i>	Fímbria S (operon)	CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	55	410	Blanco <i>et al.</i> (1997)
<i>efa</i>	Adesina de EHEC	GAGACTGCCAGAGAAAG GGTATTGTTGCATGTTTCAG	50	479	Nicholls <i>et al.</i> (2000)
<i>eae</i>	Proteína intimina	ACGTTGCAGCATGGGTAACCTC GATCGGCAACAGTTTCACCTG	56	815	Gannon <i>et al.</i> (1993)
<i>toxB</i>	Adesina de EHEC (plasmídio)	ATACCTACCTGCTCTGGATTGA TTCTTACCTGATCTGATGCAGC	55	1305	Tarr <i>et al.</i> (2002)
<i>lpfA</i> _{O157/OI-141}	Adesina de O157:H7	CTGCGCATTGCCGTAAC ATTTACAGGCGAGATCGTG	55	412	Szalo <i>et al.</i> (2002)
<i>lpfA</i> _{O157/OI-154}	Adesina de O157:H7	GCAGGTCACCTACAGGCGGC CTGCGAGTCGGAGTTAGCTG	55	525	Toma <i>et al.</i> (2004)
<i>fyuA</i>	Aerobactina (yersiniabactina)	GCGACGGGAAGCGATGACTTA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	65	740	Schubert <i>et al.</i> (1998)
<i>irp-2</i>	Aerobactina (repressor)	AAGGATTTCGCTGTTACCGGAC TCGTCCGGCAGCGTTTCTTCT	55	250	Schubert <i>et al.</i> (1998)
<i>iucA</i>	Aerobactina (síntese)	AGTCTGCATCTTAACCTTCA CTCGTTATGATCGTTCAGAT	52	1100	Okeke <i>et al.</i> (2004)
<i>fepC</i>	Aerobactina (transporte)	TACCTGGATAATGCTGTCGG ATGGTGTGATGGGGCTGGC	60	350	Okeke <i>et al.</i> (2004)
<i>sitA</i>	Transporte de ferro e manganês	CGCTGAAAGCAGTAGTTATC TTTTGACGACAGGGACCAG	59	608	Runyen-Janecky <i>et al.</i> (2003)
<i>inv</i>	Invasina de <i>Yersinia enterocolitica</i> .	CTGTGGGGAGAGTGGGGAAGTTTGG GAACTGCTTGAATCCCTGAAAACCG	64	570	Rasmussen <i>et al.</i> (1994)
<i>ial</i>	Fragmento de pInv de EIEC	GTGGATGGTATGGTGAGG GGAGGCCAACAAATTATTCC	56	320	Nataro e Kaper (1998)
<i>invA</i>	Invasina de <i>Salmonella</i>	TGCCTACAAGCATGAAATGG AAACTGGACCACGGTGACAA	52	457	Stone <i>et al.</i> (1994)
<i>ibeA</i>	Proteína de invasão de <i>E. coli</i>	TGAACGTTTCGGTTGTTTTG TGTTCAAATCCTGGCTGGAA	52	800	Germon <i>et al.</i> (2005)
<i>iha</i>	Adesina similar <i>Vibrio cholerae</i> IrgA	CAGTTCAGTTTCGCATTCACC GTATGGCTCTGATGCGATG	55	602	Schmidt <i>et al.</i> (2000)
<i>chuA</i>	Proteína Heme (transporte)	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	55	279	Clermont <i>et al.</i> (2000)

3.6.3.6.1- Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico seguiu a metodologia descrita por Van Soolingen *et al.* (1991). O DNA genômico bacteriano foi extraído a partir de 4 ml de crescimento bacteriano a 37°C por 18 horas em LB. A suspensão celular foi centrifugada (3 minutos a 12000 g) e o precipitado lavado duas vezes com o tampão TE através de centrifugação a 12000 g por 1 minuto. Ao precipitado seco foram adicionados 50 µl de lisozima (10 mg/ml) e 10 µl de RNase (5 mg/ml). A suspensão foi homogenizada em vórtex e incubada a 37°C por três horas. Após esse período, foi adicionada, uma mistura de 70 µl de SDS a 10% e 5 µl de proteinase K (10 mg/ml). A suspensão foi, então, homogenizada em vórtex e incubada a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 100 µl de NaCl 5 M e a mesma quantidade de uma solução pré-aquecida a 65°C de CTAB/NaCl. A suspensão foi agitada em vórtex até a formação de um líquido de aspecto leitoso e incubada a 65°C durante mais 10 minutos. Após este processo, foram adicionados 750 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) sendo a mistura agitada em vórtex por 10 segundos. O material foi centrifugado por 5 minutos a 12000 g e o sobrenadante aquoso cuidadosamente transferido para outro tubo. O DNA foi, então, precipitado com 0,6 volumes de isopropanol a - 20°C e a mistura mantida a - 20°C durante 30 minutos. Após esse período, a solução foi centrifugada, a 12000 g por cinco minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado por centrifugação (12000 g por 5 minutos) com etanol 75% a - 20°C. O DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso cuidadosamente em tampão TE. A dosagem de DNA foi realizada a partir da leitura em espectrofotômetro ao comprimento de 260 nm e 280 nm de acordo com Sambrook *et al.* (1989).

3.6.3.6.2- Reação (PCR)

As condições de reação e quantidades dos reagentes encontram-se na tabela abaixo.

Tabela V – Concentração dos reagentes utilizados no teste de PCR.

COMPONENTES	VOLUME (μ l)	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água deionizada esterilizada	(qsp - 100 μ l)	_____
10x "PCR Buffer" (Invitrogen®)	10	1 x
10 mM "dNTP mixture" (Invitrogen®)	2	0,2 mM cada
Iniciador 1	_____	50 pmol
Iniciador 2	_____	50 pmol
50 mM MgCl ₂ (Invitrogen®)	3	1,5 mM
DNA (amostras)	10	_____
"Taq - DNA Polimerase" (5 U) (Invitrogen®)	0,5	2,5 U
TOTAL	100	_____

3.6.3.6.3 – Análise do Resultado das Reações de PCR

Um volume de 10 µl de cada reação de PCR foi analisado através de eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% (submerso em tampão TEB 1X). Após a eletroforese, o gel foi colocado em uma cuba com solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) (Sambrook, *et al.*, 1989). Após 30 minutos o gel foi visualizado sob luz UV em câmara escura.

3.6.3.7- Determinação do perfil de proteínas de superfície

Para a determinação do perfil de proteínas, extrações de proteínas de superfície das amostras estudadas foram realizadas, conforme descrito por Schnaitman *et al.* (1971) sendo o material submetido a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 12,5%, conforme descrito por Hames & Rickwood (1982). O perfil eletroforético de proteínas das diferentes linhagens estudadas (selvagem, transconjugante, mutante e receptora) foi analisado e comparado.

3.6.3.7.1- Extração de proteína de superfície

A extração de proteínas de superfície foi realizada segundo Schnaitman *et al.* (1971). As linhagens bacterianas foram inoculadas em meio LB e incubadas a 37°C por 24 horas e, em seguida, semeadas em 5 placas de meio LA e, novamente, incubadas à mesma temperatura, pelo mesmo tempo. Para alguns testes, as linhagens bacterianas foram semeadas em placas contendo diferentes tipos de meio, como o Ágar Sangue, Minca ágar, BHI ágar e TSA. Três mililitros de solução salina 0,85%, esterilizada, foram adicionados à primeira placa e com auxílio de uma alça de Drigalski o crescimento bacteriano foi cuidadosamente raspado e transferido sucessivamente para as demais placas. O conteúdo foi passado para um recipiente esterilizado e as placas foram novamente lavadas com salina. Utilizando uma seringa de 5 ml foi feito o “shearing” (agitação) por 10 vezes e o conteúdo transferido para tubos tipo “eppendorf” para serem momentaneamente homogenizados. As amostras foram aquecidas a 65°C por 5 minutos e centrifugadas a 12000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos limpos e TCA 40% foi adicionado para uma concentração final de 10%. Os tubos foram agitados e mantidos em gelo por 30 minutos. Após centrifugação por 5 minutos a 12000 g o sedimento foi descartado e 1 ml de etanol:éter (1:1) adicionado, os tubos homogenizados e

mantidos em gelo por 30 minutos (2 vezes). O material foi novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensionado em 200 µl de PBS. Após este procedimento, foram acrescentados 200 µl do tampão de ressuspensão e estes submetidos à fervura por 5 minutos e logo depois à centrifugação por 5 minutos a 12000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e congelado a - 20°C. Uma alíquota de 20 µl de cada amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida 12,5% e corado como descrito adiante.

3.6.3.7.2- Coloração do gel de acrilamida

Após a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida foi inicialmente fixado (50% de metanol + 12% de ácido acético glacial) por 1 hora, lavado três vezes com etanol 50% por 20 minutos e, em seguida, lavado com uma solução de pré-tratamento (tiosulfato de sódio 0,02%) por 1 minuto e três vezes com água deionizada por 20 segundos. A seguir, o gel foi lavado duas vezes, consecutivamente, com solução de impregnação por 20 minutos, com água deionizada por 20 segundos e com solução de revelação por 20 segundos. Após duas lavagens com água deionizada, o gel ficou por 10 minutos em contato com a solução “stop”, e finalmente o gel foi conservado em solução de etanol 50%.

3.6.3.8- Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras bacterianas foram crescidas por 24 horas a 37°C. Para a observação, as linhagens foram centrifugadas durante 30 segundos a 12000 g e cuidadosamente ressuspensionadas em 200 µl de solução salina 0,85%. Uma tela de 400 “mesh” coberta com Formvar foi depositada sobre uma gota de cada suspensão bacteriana (com a superfície da cobertura de Formvar em contato com a suspensão) e essa colocada sobre uma superfície de papel Parafilm durante um minuto. A seguir, a tela foi seca com papel absorvente e depositada novamente com a superfície coberta com Formvar sobre uma gota de PTA (ácido fosfotungstícico) a 1% durante 30 segundos. Após 24 horas, as telas foram secas em Evaporador de Carbono e observadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (modelo LEO 906).

3.6.3.9- Microscopia Eletrônica de Varredura

3.6.3.9.1- Preparo das amostras bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas nesse estudo, bem como as linhagens controle, foram semeadas em LB e incubadas por 18 horas a 37°C.

3.6.3.9.2- Preparo das células HEp-2

A metodologia utilizada foi aquela descrita por Scaletsky *et al.* (1984), com algumas modificações. As células foram cultivadas em microplacas (Falcon, USA) com 24 orifícios em atmosfera de CO₂, contendo 1 ml de meio Eagle acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de antimicrobianos (Penicilina/Estreptomicina - Nutricell®). A estas microplacas, previamente, foram colocadas em cada orifício lamínulas redondas esterilizadas de 10 mm de diâmetro. O crescimento das monocamadas foi acompanhado pela observação após 24-48 horas em microscópio invertido. A cultura foi considerada ideal para o teste quando as células apresentavam cerca de 50% ou mais de confluência da monocamada, e apresentavam baixa refração, sem deslocamento.

3.6.3.9.3- Adesão

Após a formação da monocamada celular, as lamínulas foram lavadas três vezes com tampão PBS esterilizado, e em cada orifício foi adicionado 1,0 ml de meio Eagle contendo 2% de soro fetal bovino. Em seguida, cada linhagem bacteriana crescida por 18 horas em caldo simples foi adicionada a cada orifício na quantidade de 40 µl. A microplaca foi incubada por 6 horas a 37°C e, após este período, lavada dez vezes com 1 ml de PBS 0,01 M (pH 7,4) por orifício. As lamínulas foram fixadas usando a mistura de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2% durante 4 horas à temperatura ambiente (Kitajima *et al.*, 1999). Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS 0,01 M (pH 7,4) e fixadas, durante 2 horas, com tetróxido de ósmio 1% (v/v) e ácido tânico 2% (v/v).

3.6.3.9.4- Preparação das lamínulas para o Microscópio de Varredura

O material foi desidratado gradativamente com álcool etílico, levado ao ponto crítico com CO₂ e cobertos com uma camada de ouro em evaporador BALZERS (200 segundos, 40 mA), para facilitar a observação em microscópio de varredura (JEOL 5800 LV), Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB, UNICAMP.

3.6.3.10- Teste de “Fluorescence actin staining” (FAS)

Este teste foi realizado segundo metodologia descrita por Knutton *et al.* (1989). Inicialmente, as células HEp-2 foram cultivadas em microplacas de 24 orifícios, contendo lamínulas de 13 mm de diâmetro. Após a obtenção da monocamada celular, os tapetes celulares foram lavados três vezes com PBS 0,01 M (pH 7,4), e o meio substituído por 1ml de Eagle suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de D-manose. A cada orifício foram adicionados 40 µl do cultivo bacteriano de 18 horas. Após a preparação em duplicata, as placas foram incubadas por 3 horas. Depois da incubação, os orifícios foram lavados com PBS 0,01 M (pH 7,4) por cinco vezes, e em seguida foi feita a reposição de um novo meio (Eagle + 2% de SFB + 1% de D-manose), seguindo-se incubação por mais 3 horas a 37°C, em estufa de CO₂. Decorrido este período, os orifícios foram lavados mais três vezes com PBS e o material fixado com formaldeído a 5% em PBS por 15 minutos.

Após a fixação, cada orifício foi novamente lavado com PBS para a remoção do fixador e, em seguida, os tapetes celulares foram lavados com uma solução de 0,1% Triton X-100, em PBS, por 5 minutos. O objetivo deste procedimento foi permeabilizar as células para permitir acesso da faloidina ao compartimento intracelular. Após este procedimento, os tapetes foram lavados três vezes com PBS, e acrescentada uma solução de faloidina (FITC Labeled – Sigma®) marcada com fluoresceína a 5 µg/ml de PBS. O material foi incubado por 30 minutos protegido da presença de luz (a placa foi coberta com papel alumínio). Após a incubação, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS e montadas em glicerol-PBS (9:1). Finalmente, as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência e contraste de fase. A presença de pontos com alta intensidade de fluorescência nos locais que apresentavam bactérias, visíveis na microscopia de contraste de fase, correspondem ao acúmulo de actina polimerizada (FAS positivo).

3.6.4- Conjugação entre linhagens selvagens e a receptora HB101

Os ensaios de conjugação foram realizados como descrito por Azevedo & da Costa (1973). As linhagens foram inoculadas e mantidas em meio LB a 37°C até que atingissem a fase exponencial (doadora) e de platô (receptora). Em seguida, 1 ml de cada amostra foi transferido para tubos tipo eppendorfs e centrifugadas a 12000 g por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com salina 0,85% esterilizada e novamente submetido à centrifugação. A linhagem doadora foi ressuspensa em 75 µl de meio LB, todo o conteúdo passado para o tubo da receptora e este, cuidadosamente, ressuspensa com o auxílio de uma micropipeta. Uma membrana “millipore” (membrana GS em éster de celulose de 0,02 µm de poro e 25 mm de diâmetro) foi colocada em uma placa com meio LA e 100 µl do material foram colocados sobre o filtro. A placa foi mantida por 2 horas à temperatura ambiente e por 18 horas a 37°C. A membrana foi transferida para um tubo contendo LB e este agitado, sendo 1 ml da suspensão bacteriana passada para um tubo tipo “eppendorf”. Após centrifugação, por 30 segundos, a 12000 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com salina esterilizada. Um volume de 100 µl das diluições, 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} e, sem diluição, foram plaqueados em meio LA contendo os antimicrobianos aos quais as linhagens doadora e receptora eram resistentes e, após 18-24 horas a 37°C, as colônias bacterianas analisadas quanto ao seu perfil plasmidial.

3.6.5- Mutagenização com o transposon TnphoA

A obtenção de amostras mutantes, a partir das amostras transconjugantes, foi realizada segundo a metodologia descrita por Taylor *et al.* (1989). As amostras bacterianas a serem mutagenizadas, e a linhagem de *E. coli* SM10 (pRT 733), a qual contém o transposon TnphoA, foram crescidas em meio LB, incubadas a 37°C por 18 horas e, a seguir, conjugadas conforme metodologia descrita por Azevedo & da Costa (1973) (item 3.6.4). A seleção dos mutantes foi realizada em placas contendo meio LA adicionado de 40 µl/ml de XP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e os antimicrobianos aos quais as linhagens doadora e receptora eram resistentes (kanamicina, estreptomicina e tetraciclina). As colônias azuis obtidas nesse meio de cultura, indicando a produção de fosfatase alcalina, foram armazenadas em meio Hogness a - 80°C para análise do perfil plasmidial e demais características.

3.6.6- Caracterização das amostras transconjugantes e mutantes obtidas

Os ensaios do item 3.6.3 (caracterizações biológicas e genéticas) foram realizados para as amostras transconjugantes e mutantes obtidas.

4- RESULTADOS

4.1- REP-PCR

Os diferentes fragmentos amplificados através da técnica de REP-PCR para as linhagens bacterianas estão demonstrados na figura 1, enquanto que o dendrograma das 49 linhagens de APEC e 30 normais (aves saudáveis), encontra-se na figura 2.

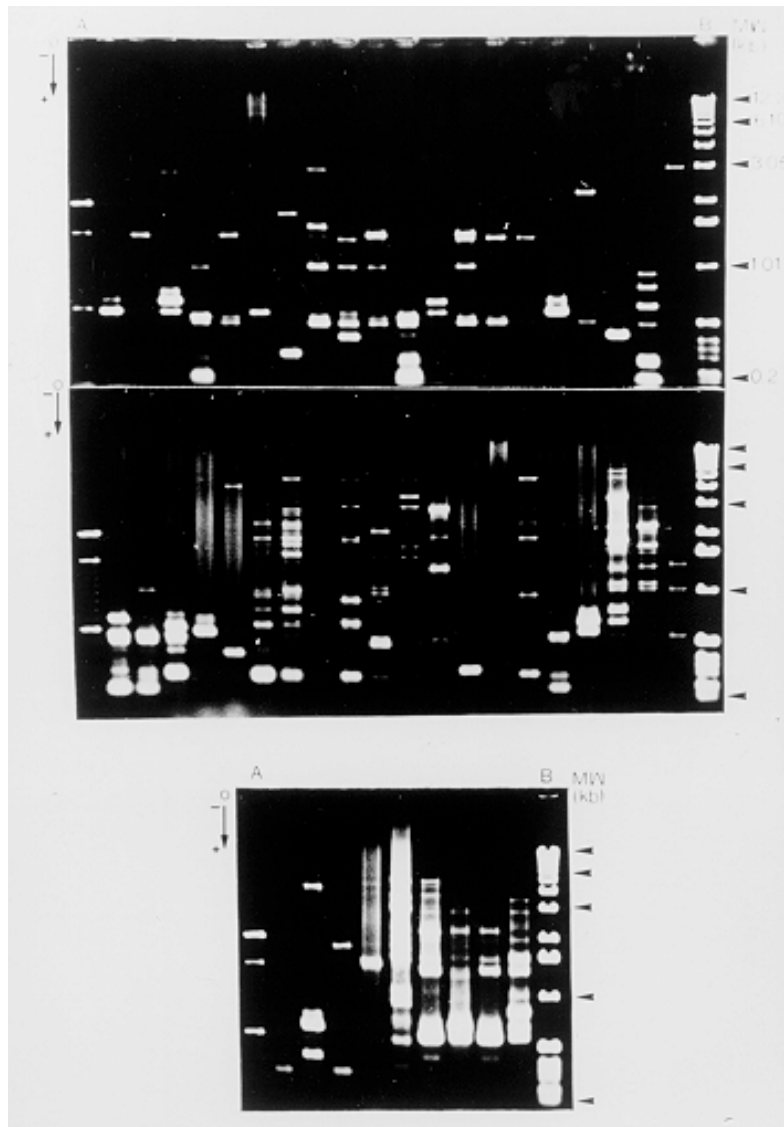


Figura 1. Foto do gel do REP-PCR das linhagens de APEC e normais.

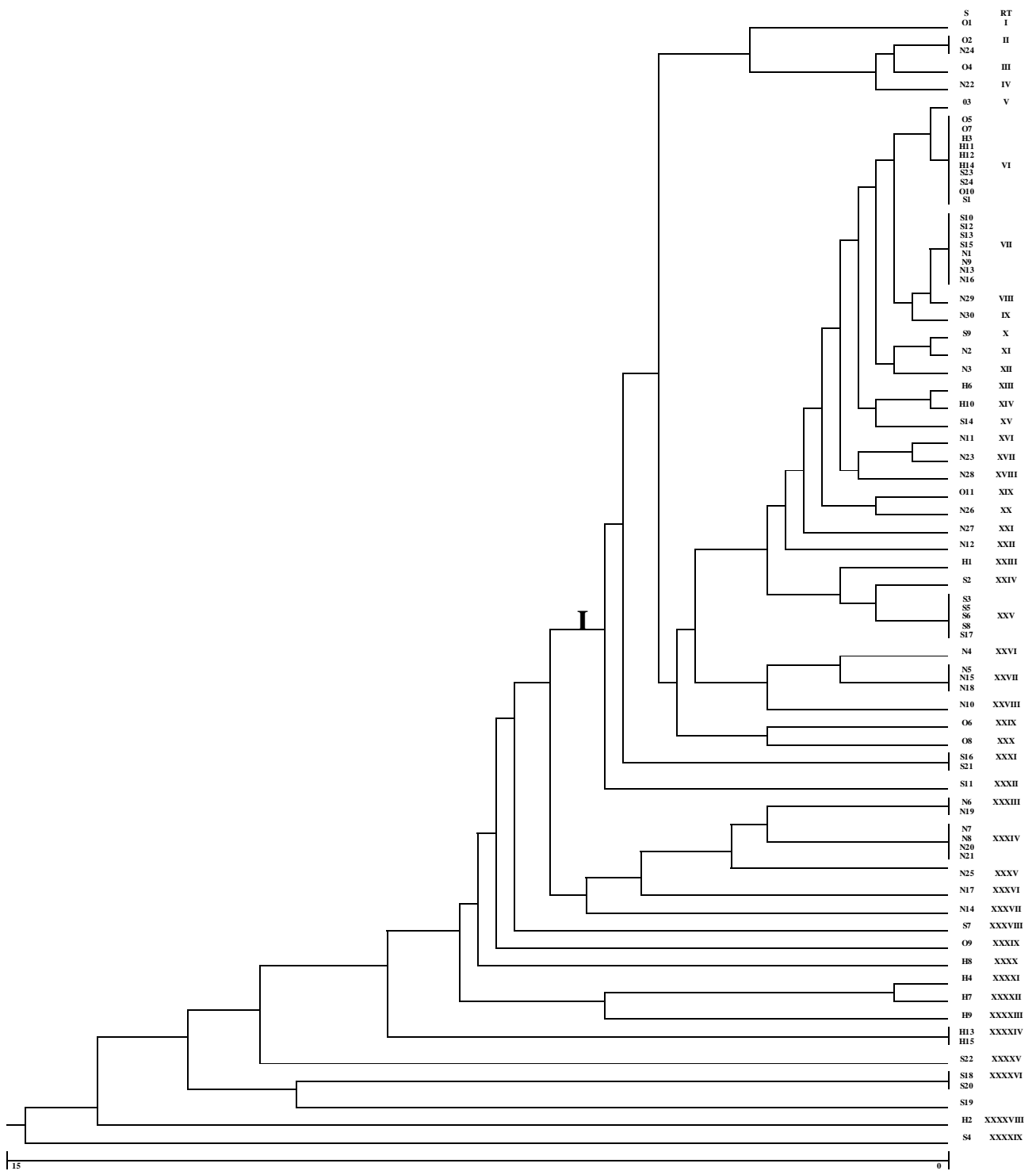


Figura 2. Dendrograma das linhagens APEC e normais, utilizando iniciadores REP-PCR.

4.2- Caracterização das linhagens de APEC selecionadas e da receptora HB101

4.2.1- Resistência aos antimicrobianos, produção de colicinas, adesão e invasão em células HEp-2 e HeLa

Das 49 linhagens de APEC (Tabela I), três linhagens (S17, S21 e SCI10) foram selecionadas para posterior teste de conjugação com a receptora HB101.

Os resultados dos testes de resistência a antimicrobianos, adesão e invasão em células HEp-2 e HeLa, produção de colicinas, das linhagens selvagens e HB101, encontram-se na tabela VI.

As capacidades de adesão e invasão em linhagens celulares cultivadas *in vitro* encontram-se demonstradas na figura 3.

Tabela VI – Caracterização biológica das linhagens selvagens e linhagem HB101.

Linhagens bacterianas	Resistência a antimicrobianos	Colicina produzida	Adesão a células (com e sem manose)				Invasão de células	
			HEp-2		HeLa		HEp-2	HeLa
			com	sem	com	sem		
S17	Tc (>500 µg/ml)	—	+	+	+	+	+	+
S21	Tc (>500 µg/ml)	—	+	+	+	+	+	+
SCI10	Km (>500 µg/ml) Tc (100 µg/ml)	Ia, Ib, E1 E3, B, K	+	+	+	+	+	+
HB101	Sm (>500 µg/ml)	—	—	—	—	—	—	—

ANTIMICROBIANOS: Tetraciclina (Tc); Kanamicina (Km) e Estreptomicina (Sm).

ADESÃO E INVASÃO: (+) adesão positiva; (-) adesão negativa.

COLICINA: (-) não produzem colicinas.

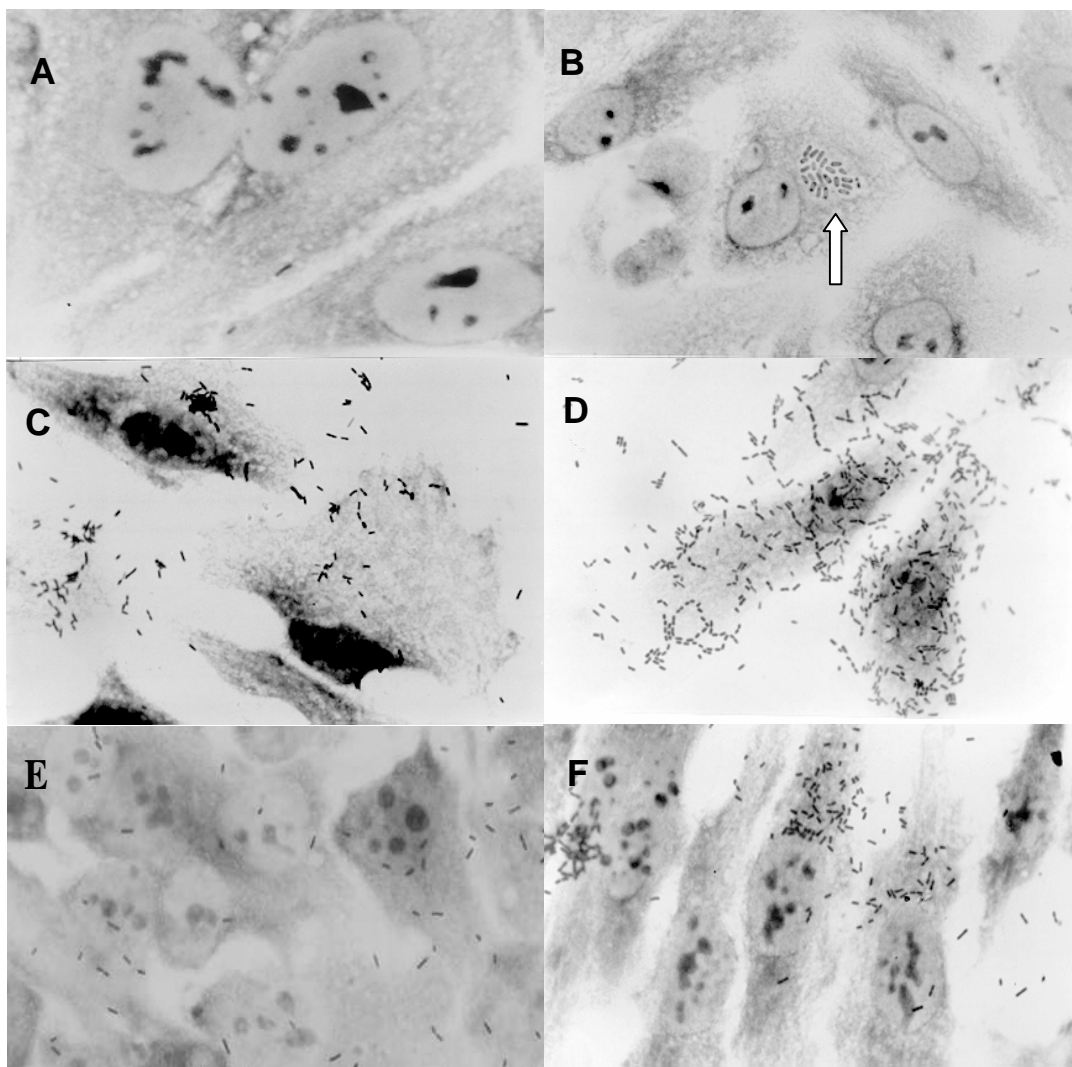


Figura 3. Fotos do teste de adesão e invasão em células HeLa e HEp-2, cultivadas *in vitro*, das linhagens selvagens e da receptora HB101. **A:** Adesão negativa da linhagem HB101 em HEp-2 (sem manose). **B:** Invasão da linhagem S17 (selvagem) em HeLa. **C:** Adesão da linhagem S17 (selvagem) em HeLa (com manose). **D:** Adesão da linhagem SCI10 (selvagem) em HeLa (com manose). **E:** Adesão da linhagem S21 (selvagem) em HeLa (com manose). **F:** Adesão da linhagem S21 (selvagem) em HEp-2 (sem manose). Magnificação de 1000X. A seta indica a provável invasão das bactérias.

4.2.2 – Perfil plasmidial das linhagens selvagens e da receptora HB101

Todas as linhagens selvagens utilizadas neste estudo (S17, S21 e SCI10) apresentaram a presença de plasmídios. A linhagem S17 apresentou um plasmídio com peso molecular aproximado de 70 MDa (figura 7/canaleta 3). A linhagem S21 apresentou somente um plasmídio com peso molecular aproximado de 30 MDa (figura 8/canaleta 3). Já a linhagem SCI10 apresentou um plasmídio de alto peso molecular (aproximadamente 120 MDa) (figura 9/canaleta 3) e vários plasmídios de baixo peso molecular (abaixo de 5,2 MDa). A amostra receptora HB101 não apresentou a presença de plasmídios (figura 7/canaleta 5, figura 8/canaleta 6 e figura 9/canaleta 5).

4.2.3 – PCR para os fatores de virulência linhagens de APEC selecionadas e da receptora HB101

A linhagem HB101 (não patogênica) apresentou amplificação apenas para o par de iniciadores específicos para o gene *csgA* (figura 13/canaleta 2). A linhagem selvagem S17 apresentou amplificação de fragmentos de DNA com os iniciadores específicos para os genes *lpfA*_{O157/O1-154}, *fimA*, *csgA* (figura 13/canaleta 3) e *crl* (figura 14/canaleta 2), enquanto que a linhagem selvagem S21, apresentou amplificação de fragmentos de DNA com os iniciadores específicos para os *lpfA*_{O157/O1-154}, *fimA*, *csgA* (figura 13/canaleta 5), *crl* (figura 14/canaleta 4), *tsh* (figura 4/canaleta 2) e *iucA* (figura 5/canaleta 4). A linhagem SCI10 apresentou amplificação de fragmentos de DNA com os iniciadores específicos para os genes *lpfA*_{O157/O1-154}, *fimA*, *csgA* (figura 13/canaleta 7), *crl* (figura 14/canaleta 6) e *fepC* (figura 6/canaleta 4). Nenhuma dessas linhagens apresentaram amplificação com iniciadores para os demais genes descritos na tabela IV.

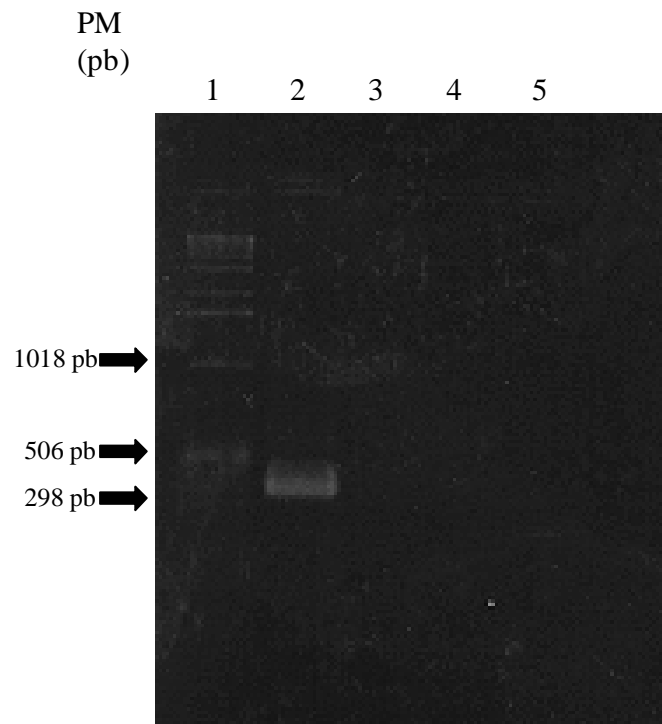


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do teste de PCR para o gene *tsh*. **1:** DNA LADDER (1 Kb). **2:** Linhagem S21 (selvagem). **3:** Linhagem S17. **4:** Linhagem SCI10. **5:** Linhagem HB101.

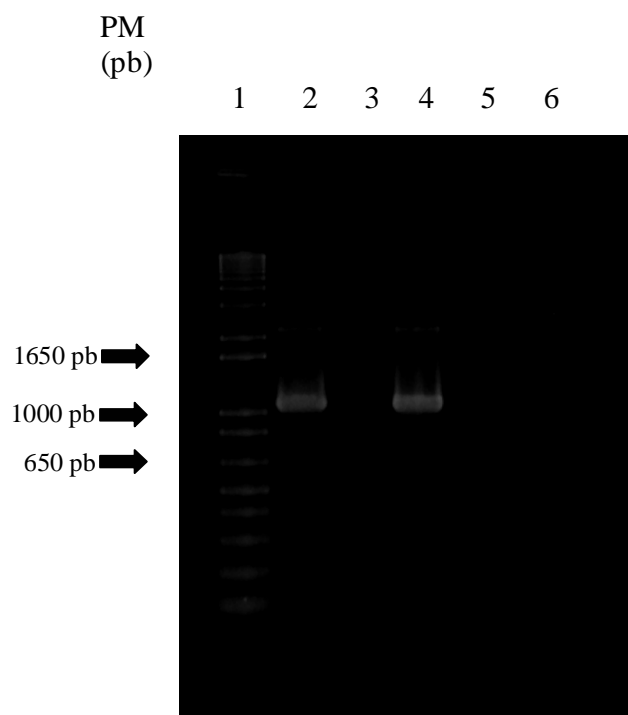


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1,0% do teste de PCR para o gene *iucA*. **1:** DNA LADDER (1 Kb plus). **2:** Linhagem O42 (controle positivo) **3:** Linhagem HB101. **4:** S21 (selvagem). **5:** Linhagem S17. **6:** Linhagem SCI10.

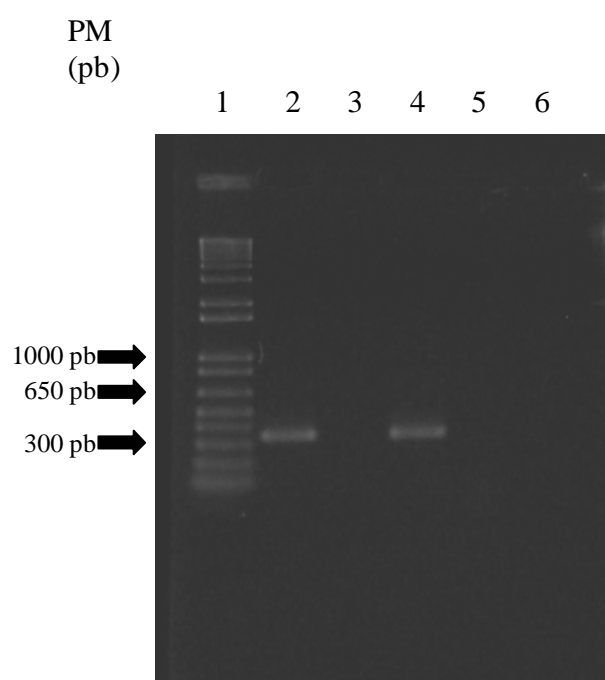


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1,0% do teste de PCR para o gene *fepC*. **1:** DNA LADDER (1 Kb plus). **2:** Linhagem O42 (controle positivo) **3:** Linhagem HB101. **4:** Linhagem SCI10. **5:** Linhagem S17. **6:** Linhagem S21.

4.3 –Conjugação

Os resultados das conjugações das linhagens S17, S21 e SCI10, com a receptora HB101 encontram-se na tabela abaixo.

Tabela VII- Resultados das conjugações entre as linhagens selvagens e a receptora HB101.

Linhagens envolvidas	n° colônias obtidas
S17 x HB101 (Tc ^R) (Sm ^R)	7 colônias Tc ^R e Sm ^R (S17-1, S17-2, ...)
SCI10 x HB101 (Tc ^R Km ^R) (Sm ^R)	215 colônias Tc ^R , Km ^R e Sm ^R (SCI10-1, SCI10-2, ...)
S21 x HB101 (Tc ^R) (Sm ^R)	35 colônias Tc ^R e Sm ^R (S21-1, S21-2, ...)

(X): Conjugação

RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS: Tc^R : Resistência à tetraciclina

Km^R: Resistência à kanamicina

Sm^R: Resistência à estreptomicina

Após o teste de conjugação, algumas colônias de cada conjugação foram selecionadas ao acaso e utilizadas para testes posteriores.

4.4- Caracterização das amostras transconjugantes

4.4.1 – Perfil plasmidial das amostras transconjugantes

Na conjugação entre as linhagens S17 e HB101, somente o plasmídio de 70 MDa foi transferido para a receptora (figura 7/canaleta 4), enquanto que os plasmídios de 30 MDa e de 120 MDa, foram transferidos, respectivamente das linhagens S21 e SCI10 (respectivamente figura 8/canaletas 4 e 5, figura 9/canaleta 4).

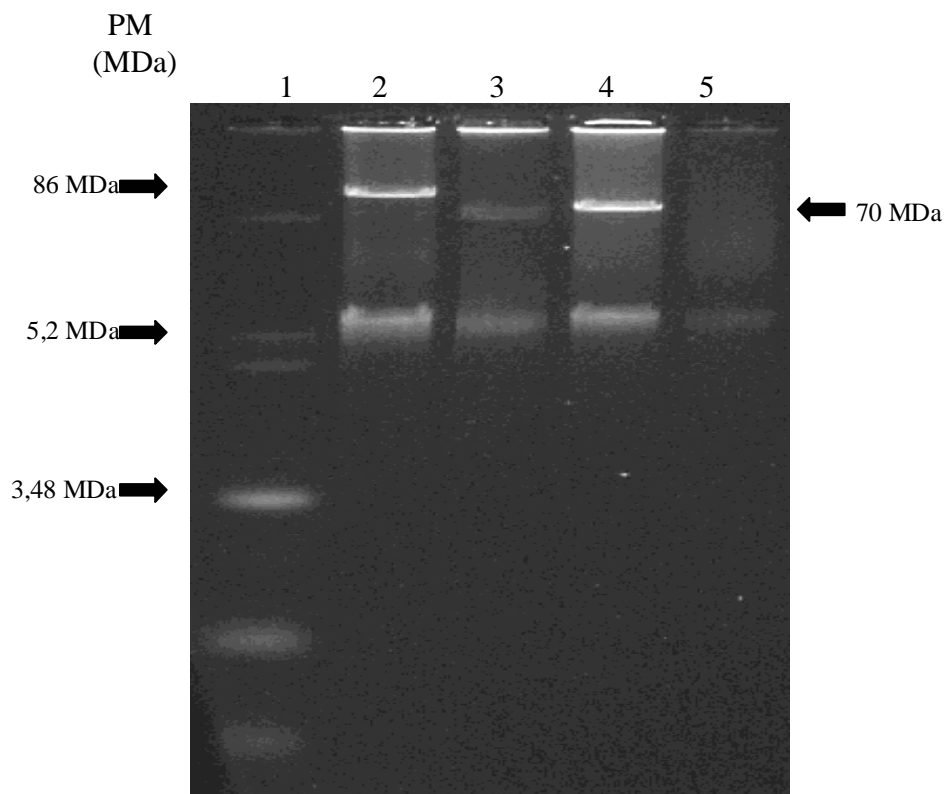


Figura 7. Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose a 0,8%. **1:** Linhagem V517. **2:** Plasmídio pRA1. **3:** Linhagem S17 (selvagem). **4:** Linhagem S17-1 (transconjugante). **5:** Linhagem HB101.

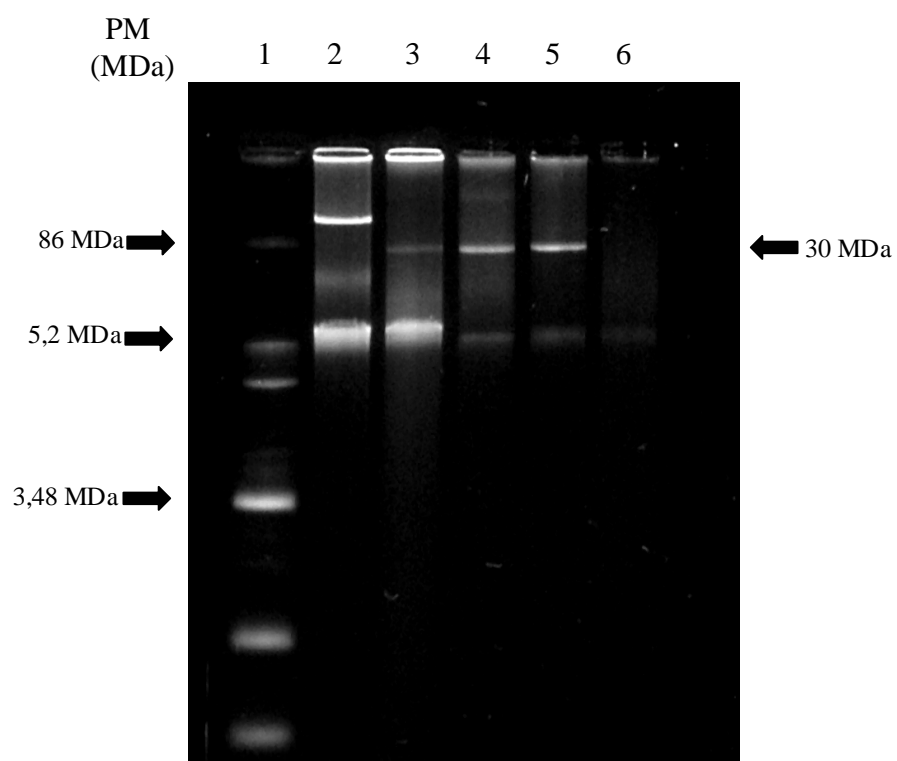


Figura 8. Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose a 0,8%. **1:** Linhagem V517. **2:** Plasmídeo pRA1. **3:** Linhagem S21 (selvagem). **4:** Linhagem S21-1 (transconjugante). **5:** Linhagem S21-2 (transconjugante). **6:** Linhagem HB101.

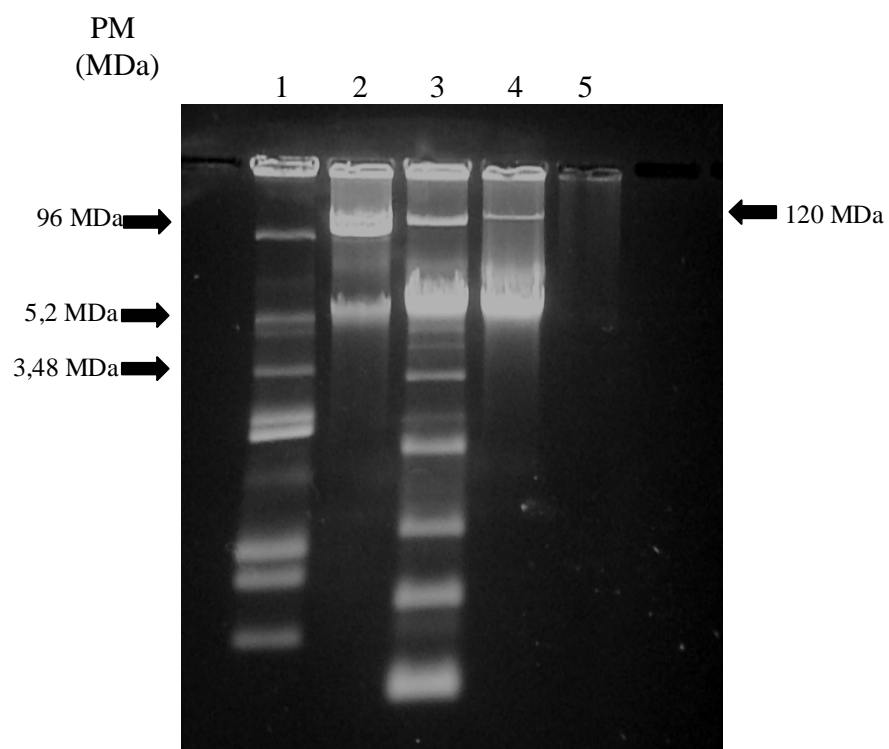


Figura 9. Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose a 0,8%. **1:** Linhagem V517. **2:** Plasmídeo pR40a. **3:** Linhagem SCI10 (selvagem). **4:** Linhagem SCI10-1 (transconjugante). **5:** Linhagem HB101.

4.4.2- Resistência aos antimicrobianos, produção de colicinas, adesão e invasão em células HEp-2 e HeLa

Os resultados dos testes de resistência a antimicrobianos, adesão e invasão em células HeLa e HEp-2 e produção de colicinas das amostras transconjugantes, encontram-se nas tabelas abaixo (VIII e IX). As figuras 11 e 12 demonstram a capacidade de adesão da linhagem recombinante S17-1 em células HEp-2 e HeLa, respectivamente.

Tabela VIII – Caracterização biológica das amostras transconjugantes.

Linhagens bacterianas	Resistência a antimicrobianos	Produção de colicina	Adesão a Células (com e sem manose)				Invasão de Células	
			HEp-2		HeLa		HEp-2	HeLa
			com	sem	com	sem		
S17-1 (transc.)	Tc (>500 µg/ml) Sm (>500 µg/ml)	—	+	+	+	+	+	+
S21-1 (transc.)	Tc (>500 µg/ml) Sm (>500 µg/ml)	—	—	—	—	—	—	—
SCI10-1 (transc.)	Km (>500 µg/ml) Tc (100 µg/ml) Sm (>500 µg/ml)	Ia, Ib, E1 E3, B, K	—	—	—	—	—	—
HB101	Sm (>500 µg/ml)	—	—	—	—	—	—	—

LINHAGENS: transconjugante (transc.).

ANTIMICROBIANOS: Tetraciclina (Tc); Kanamicina (Km) e Estreptomicina (Sm).

ADESÃO E INVASÃO: (+) adesão positiva; (-) adesão negativa.

COLICINA: (-) não produzem colicinas.

Tabela IX – Resultado do teste de invasão (placas de Mac Conkey) da linhagem S17 e suas derivadas.

Linhagens	UFC*/orifício (média aritmética de três repetições)
S17 (selvagem)	85.600
S17-1 (transconjugante)	12.500
HB101 (receptora)	53
EIEC (controle positivo)	95.000

- UFC- Unidades formadoras de colônias.

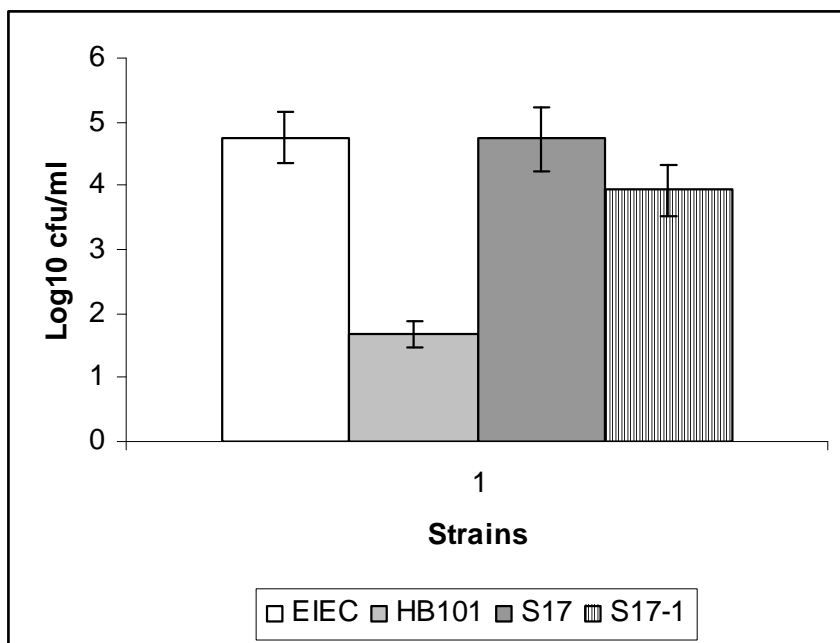


Figura 10- Teste de invasão (placas de Mac Conkey) da linhagem S17 e derivadas.

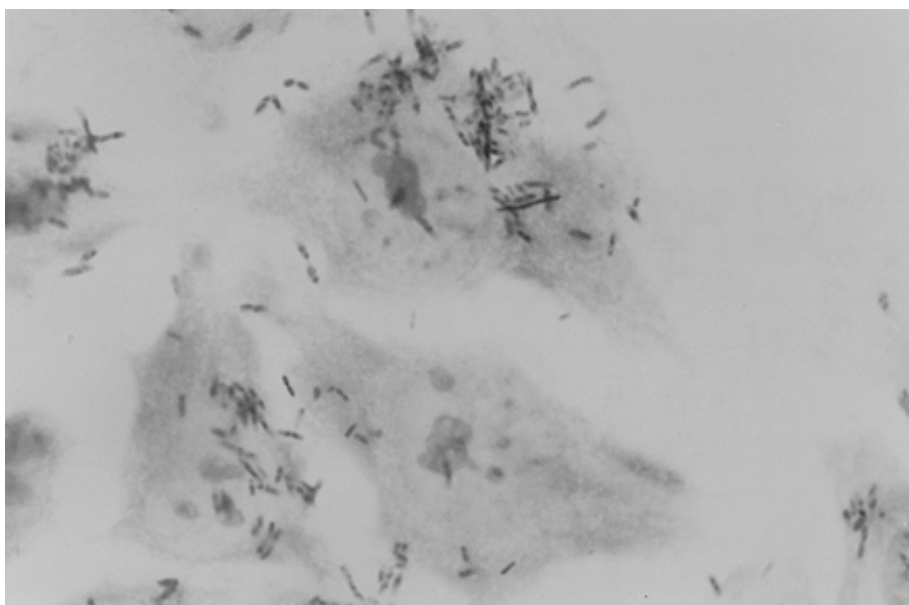


Figura 11. Foto do teste de adesão da linhagem S17-1 (transconjugante) em células HEp-2 (com D-manose). Magnificação de 1000X.

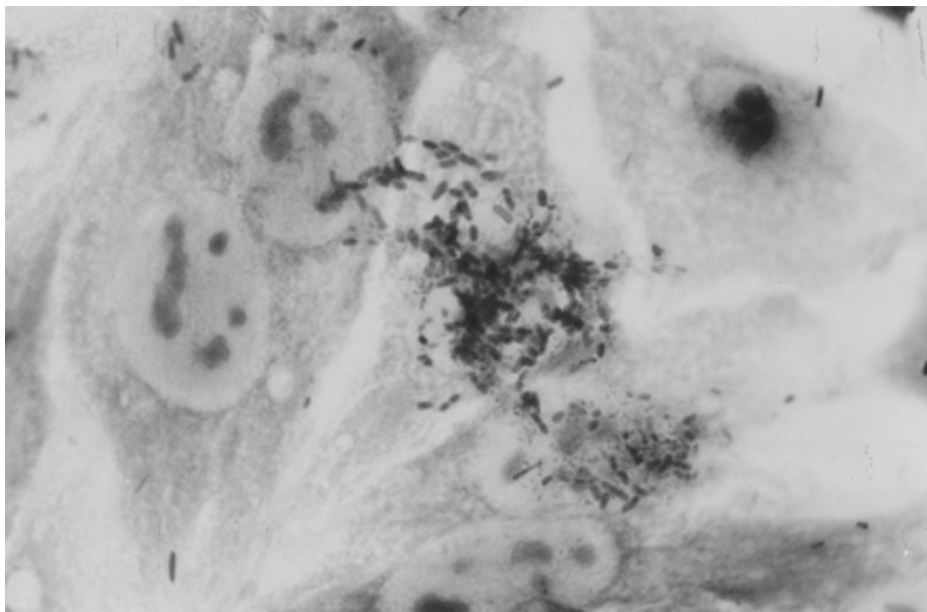


Figura 12. Foto do teste de adesão da linhagem S17-1 (transconjugante) em células HeLa (com D-manose). Magnificação de 1000X.

4.4.3- PCR para os fatores de virulência das amostras transconjugantes

Todas as amostras transconjugantes (derivadas das linhagens S17, S21 e SCI10) apresentaram amplificação de fragmentos de DNA apenas com os iniciadores para o gene *csgA* (figura 13/canaletas 4, 6 e 8). Nenhuma dessas linhagens transconjugantes apresentou amplificação de fragmentos de DNA com os demais iniciadores descritos na tabela IV.

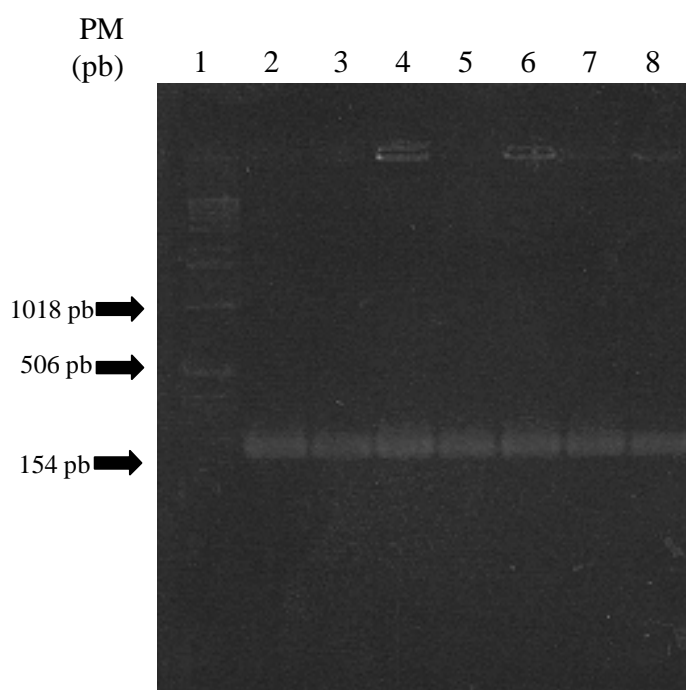


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do teste de PCR para o gene *csgA*. **1:** DNA LADDER (1 Kb). **2:** Linhagem HB101. **3:** Linhagem S17 (selvagem). **4:** Linhagem S17-1 (transconjugante). **5:** Linhagem S21 (selvagem). **6:** Linhagem S21-1 (transconjugante). **7:** Linhagem SCI10 (selvagem). **8:** Linhagem SCI10-1 (transconjugante).

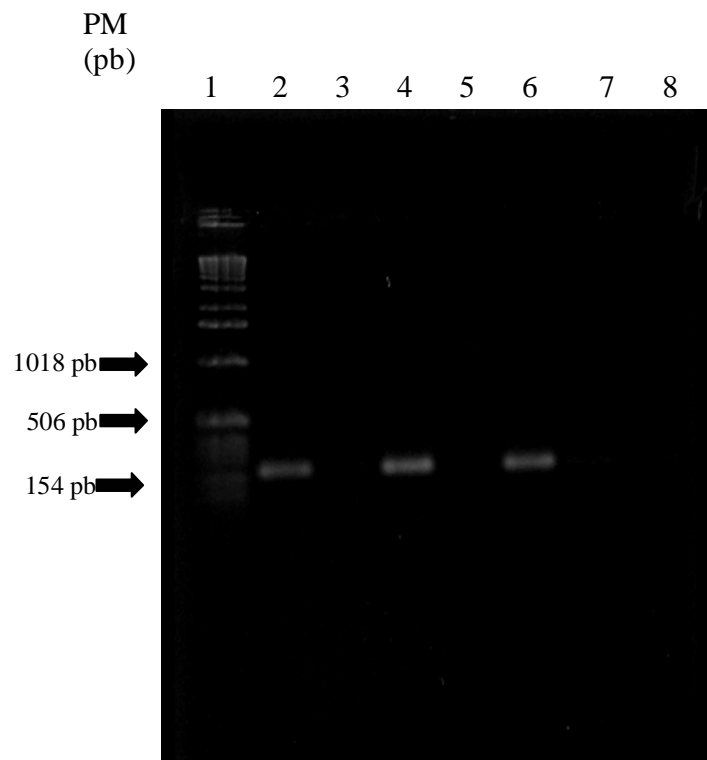


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do teste de PCR para o gene *cml*. **1:** DNA LADDER (1 Kb). **2:** Linhagem S17 (selvagem). **3:** Linhagem S17-1 (transconjugante). **4:** Linhagem S21 (selvagem). **5:** Linhagem S21-1 (transconjugante). **6:** Linhagem SCI10 (selvagem). **7:** Linhagem SCI10-1 (transconjugante). **8:** HB101.

4.5- Mutagenização da amostra transconjugante S17-1 com o transposon TnphoA

Através da conjugação da amostra transconjugante derivada da linhagem S17 (S17-1) e SM10 (plasmídeo pRT733), foram obtidas 52 colônias azuis, kanamicina, estreptomicina e tetraciclina resistentes. Algumas colônias apresentaram coloração azulada após 48 horas de incubação, sendo, também, selecionadas e estocadas para testes posteriores.

4.5.1- Perfil plasmidial das amostras mutantes

Para as amostras mutantes selecionadas, foram realizadas extrações plasmidiais em pequena escala. Após a comparação do perfil plasmidial das amostras mutantes com o perfil da amostra transconjugante, verificamos que algumas amostras apresentaram plasmídeo com peso molecular um pouco maior que da amostra transconjugante (figura 15/canaletas 4 e 5). Para confirmação dessa alteração do peso molecular do plasmídeo, novas extrações (em larga escala), foram realizadas, e através da visualização dos géis, a diferença do peso molecular se manteve ainda, nos levando a crer que esta diferença não está relacionada às condições de corrida eletroforética e/ou à técnica de extração plasmidial. As amostras que apresentaram aumento no peso molecular dos plasmídios foram então selecionadas para o teste de adesão em células HeLa e HEp-2. Algumas amostras, que não apresentaram alteração no peso molecular do plasmídeo, também foram utilizadas nesse teste.

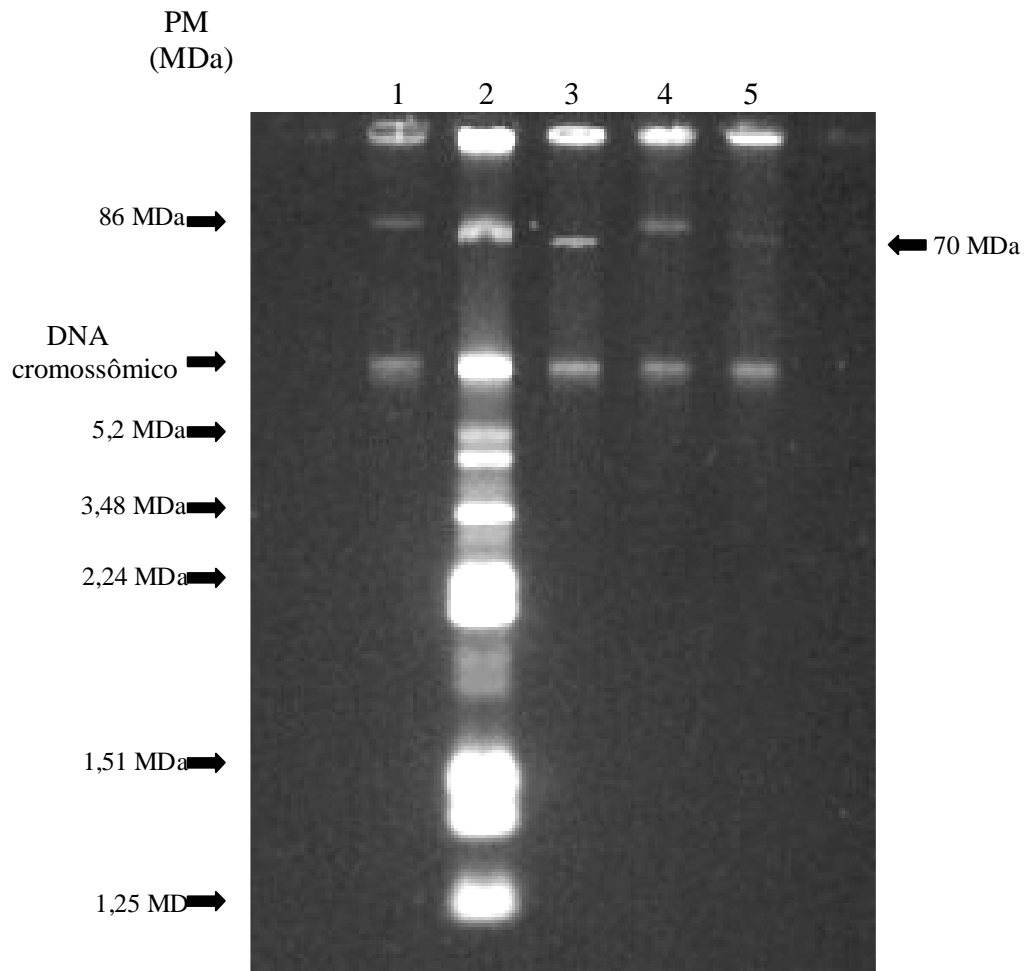


Figura 15. Perfil plasmidial (agarose 0,7%) das amostras mutantes de números 43 e 48, comparados com as linhagens originais e padrões. **1:** plasmídeo pRA1; **2:** linhagem V517 com plasmídios de 1,25 a 32,4 MDa; **3:** linhagem S17-1 (transconjugante); **4:** linhagem mutante n° 43; **5:** linhagem mutante n° 48.

4.5.2- Teste de adesão das amostras mutantes em células HEp-2 e HeLa

Das 52 colônias mutantes obtidas, 40 colônias foram testadas em relação à adesão em células HEp-2 e HeLa, sendo que dessas, 16 amostras (40%) apresentaram adesão negativa em ambos os tipos celulares. Outras 24 amostras mutantes apresentaram adesão nessas culturas celulares, sendo que algumas apresentaram adesão muito semelhante à da amostra transconjugante S17 (figura 16), e outras com menor intensidade (menor número de bactérias aderidas às células). O padrão de adesão das amostras mutantes que aderiram nessas células foi a mesma da amostra transconjugante (figura 16). Entre as amostras que apresentaram aumento no peso molecular do plasmídio (perfil plasmidial), algumas também apresentaram adesão negativa em células HEp-2 e HeLa (figura 17). As amostras mutantes de números 9 (**Mut.9**), 43 (**Mut.43**) e 48 (**Mut.48**), que apresentaram adesão negativa em ambas as culturas celulares, foram selecionadas e estocadas (congeladas a - 80°C) separadamente para estudos posteriores.

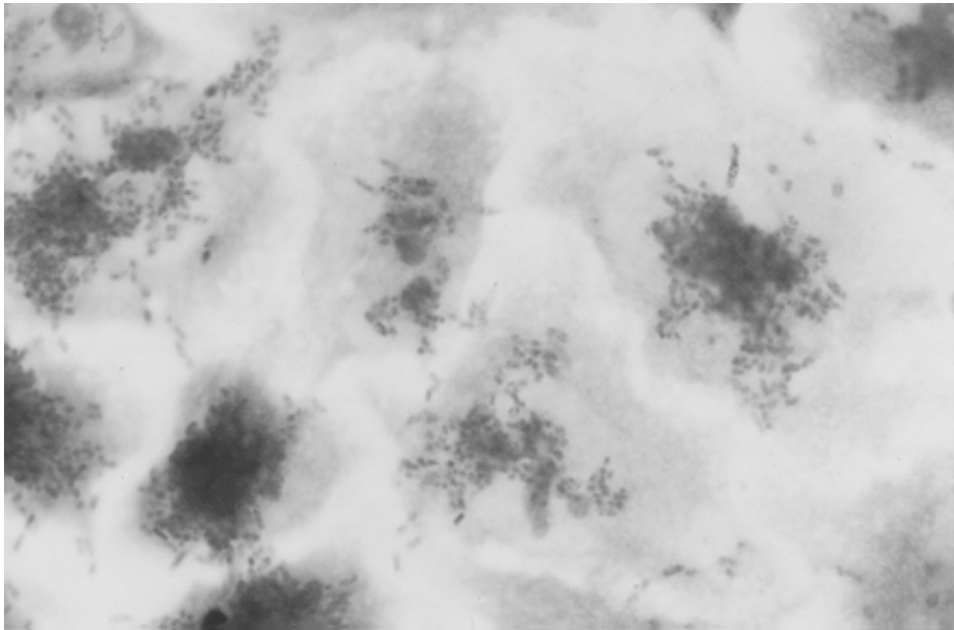


Figura 16. Teste de adesão da amostra transconjugante S17-1 em células HeLa (com D-manose). Magnificação de 1000X.

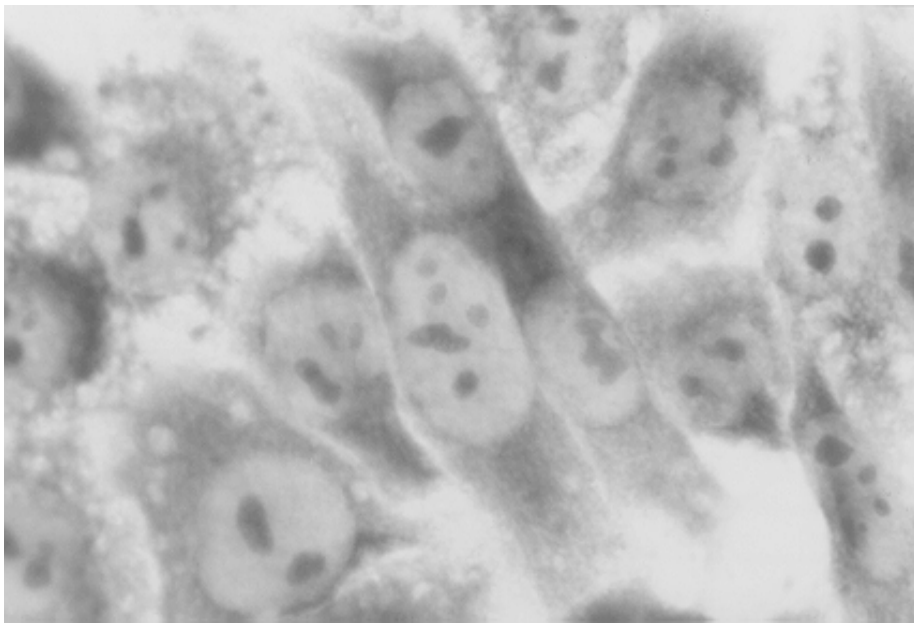


Figura 17. Teste de adesão da amostra Mut.43 (perda da adesão) em células HeLa (com manose). Magnificação de 1000X.

4.5.3- PCR para os fatores de virulência das amostras mutantes

Todas as amostras mutantes (obtidas pela transposição do *TnphoA* no plasmídio da transconjugante S17-1) amplificaram apenas com iniciadores para o gene *csgA*.

4.6- Perfil de proteínas de superfície

Determinou-se o perfil de proteínas de superfície das amostras relacionadas com a linhagem S17 (selvagem, transconjugante e mutante obtido com o uso de transposon *TnphoA*) (figuras 18, 19 e 20). Através da visualização das proteínas no gel de poliacrilamida corado pela prata, foi observada a presença de algumas proteínas (bandas), com peso molecular variando entre 60-90 KDa, nas amostras transconjugantes que estavam ou ausentes ou em quantidade muito inferior na amostra receptora HB101 (figura 18/canaletas 5 e 8), como também, proteínas (30-90 KDa) expressas em diferentes tipos de meios (BHI ágar, TSA, LA), presentes nas amostras selvagens e transconjugantes da S17, mas ausentes na receptora HB101 e Mut.43 (mutante) (figura 19/canaletas 6 e 10, figura 20/canaletas 2 e 3).

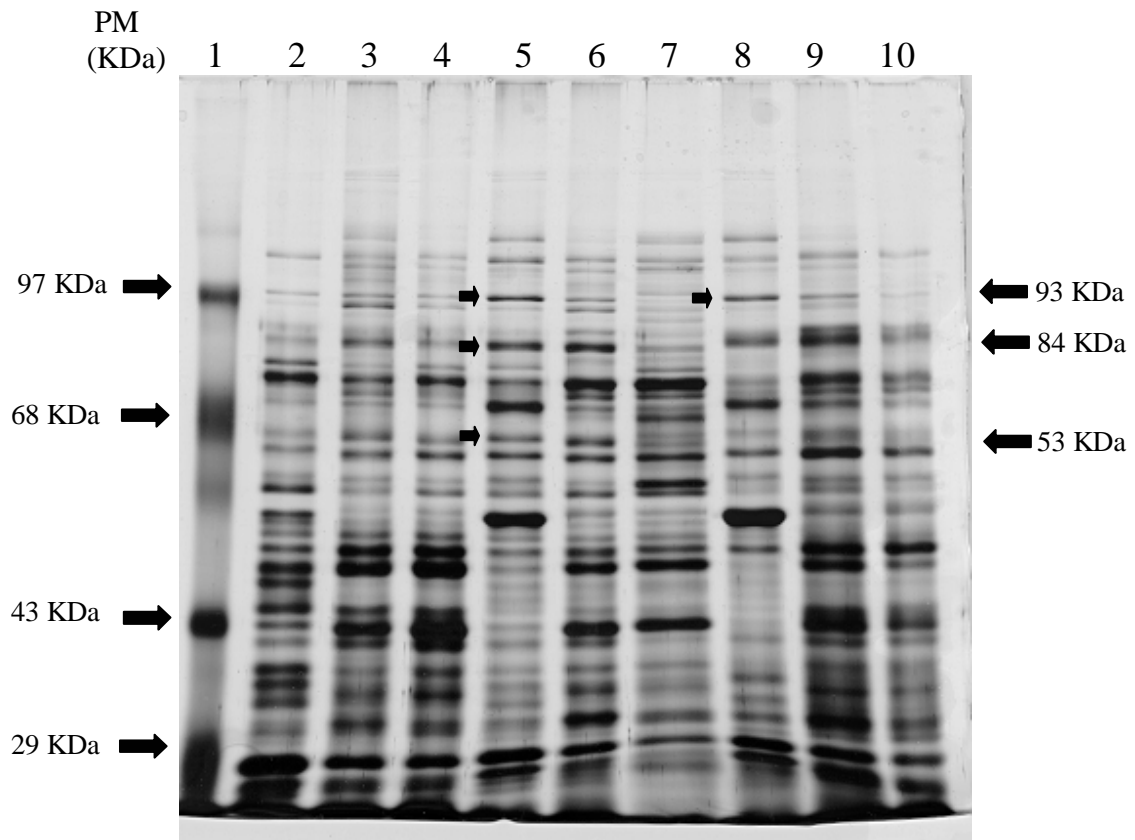


Figura 18. Gel de poliacrilamida (12,5 %) corada pela prata com proteínas de superfície das linhagens selvagens, HB101 e transconjugantes (meio LA). **1:** Padrão de peso molecular. **2:** S17 selvagem (16°C). **3:** S17-1 transconjugante (16°C). **4:** HB101 (16°C). **5:** S17 selvagem (37°C). **6:** S17-1 transconjugante (37°C). **7:** HB101 (37°C). **8:** S17 selvagem (42°C). **9:** S17-1 transconjugante (42°C). **10:** HB101 (42°C). As setas indicam prováveis proteínas envolvidas no processo de adesão da linhagem S17 (selvagem).

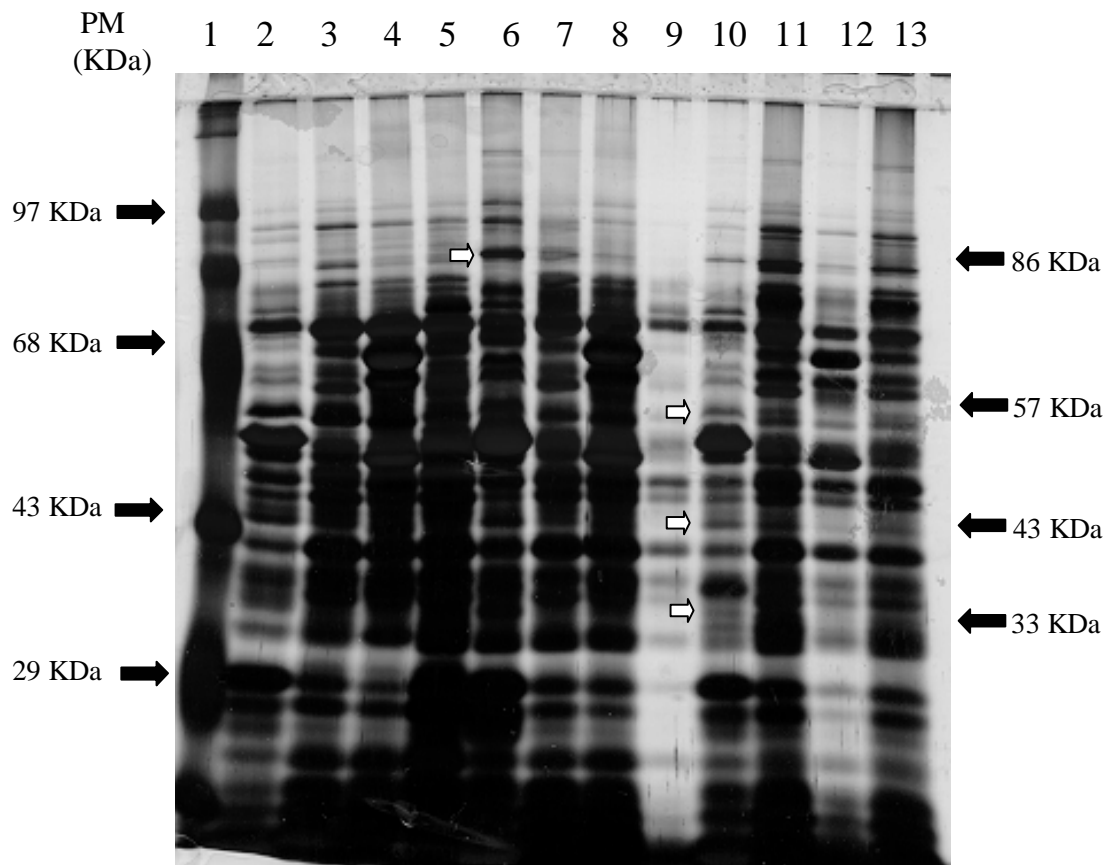


Figura 19. Gel de poliacrilamida (12,5 %) corada pela prata com proteínas de superfície das linhagens S17, S17-1, Mut.43 e HB101 (meios Minca ágar, BHI ágar, TSA). **1:** Padrão de peso molecular. **2:** S17 selvagem (37°C, Minca). **3:** S17-1 transconjugante (37°C, Minca). **4:** Mut.43 (37°C, Minca). **5:** HB101(37°C, Minca). **6:** S17 selvagem (37°C, BHI). **7:** S17-1 transconjugante (37°C, BHI). **8:** Mut.43(37°C, BHI). **9:** HB101 (37°C, BHI). **10:** S17 selvagem (37°C, TSA). **11:** S17-1 transconjugante (37°C, TSA). **12:** Mut.43 (37°C, TSA). **13:** HB101 (37°C, TSA). As setas indicam prováveis proteínas envolvidas no processo de adesão da linhagem S17 (selvagem).

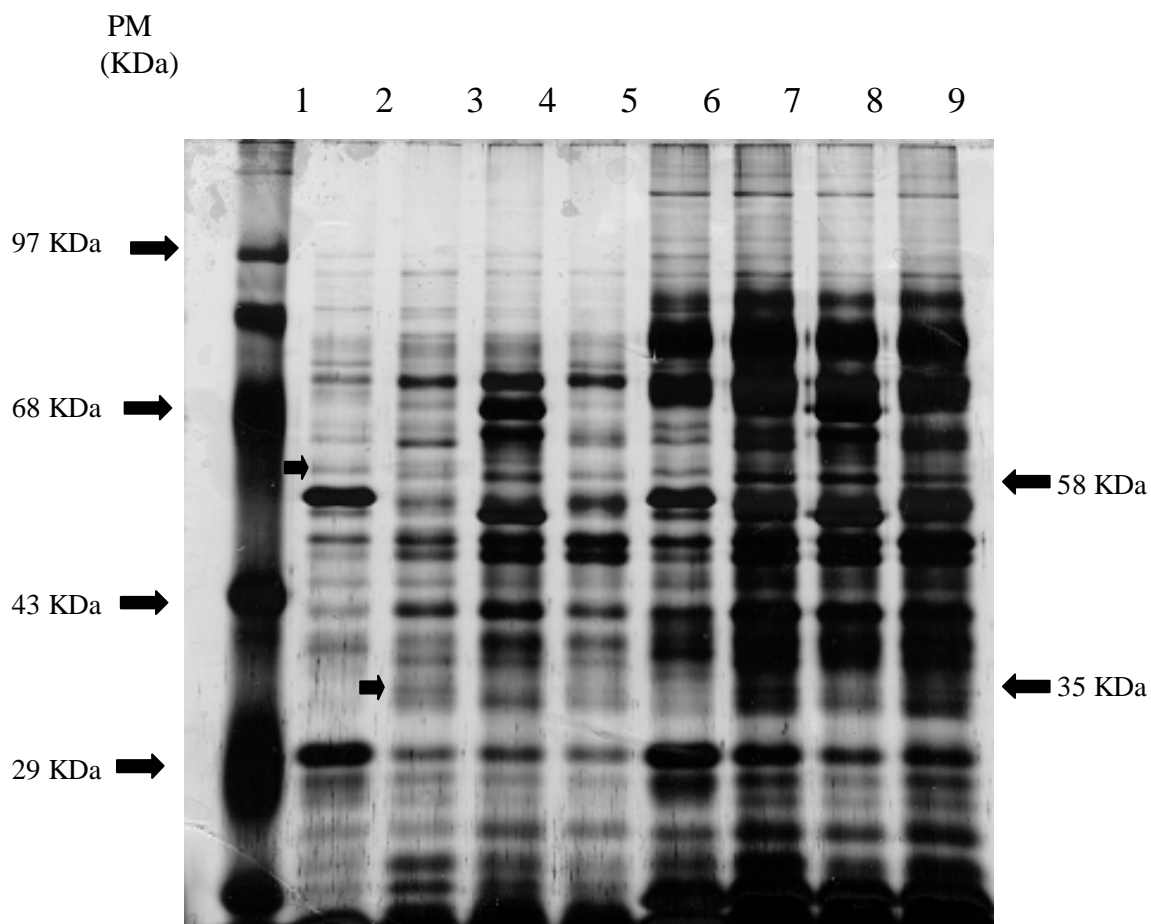


Figura 20. Gel de poliacrilamida (12,5 %) corada pela prata com proteínas de superfície das linhagens S17, S17-1, Mut.43 e HB101 (meios LA e Ágar Sangue). **1:** Padrão de peso molecular. **2:** S17 selvagem (37°C, LA). **3:** S17-1 transconjugante (37°C, LA). **4:** Mut.43 (37°C, LA). **5:** HB101(37°C, LA). **6:** S17 selvagem (37°C, Ágar Sangue). **7:** S17-1 transconjugante (37°C, Ágar Sangue). **8:** Mut.43 (37°C, Ágar Sangue). **9:** HB101 (37°C, Ágar Sangue). As setas indicam prováveis proteínas envolvidas no processo de adesão da linhagem S17 (selvagem).

4.7- Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras S17, S17-1, Mut.43 e a receptora HB101 foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão, através da técnica de coloração negativa.

Verificou-se a presença de estruturas filamentosas e finas na superfície bacteriana (prováveis fibrilas) nas linhagens S17 e S17-1 (figura 21). Nas linhagens HB101 (figura 22) e Mut.43 não foram observadas a presença dessas estruturas.

Também foi observada a presença de flagelos na linhagem selvagem S17, sendo os mesmos não encontrados nas demais amostras.

Os resultados das observações de estruturas na superfície bacteriana de todas as amostras encontram-se na tabela abaixo.

Tabela X- Resultados da Microscopia Eletrônica de Transmissão das linhagens S17, S17-1, Mut. 43 e a receptora HB101.

AMOSTRAS	SUPERFÍCIE BACTERIANA	FIBRILAS
S17	Estruturas filamentosas finas, flagelos	+
S17-1 (transconjugante)	Estruturas filamentosas finas	+
Mut.43	-	-
HB101	-	-

FIBRILAS: (+) presença de estruturas filamentosas e finas; (-) ausência dessas estruturas.

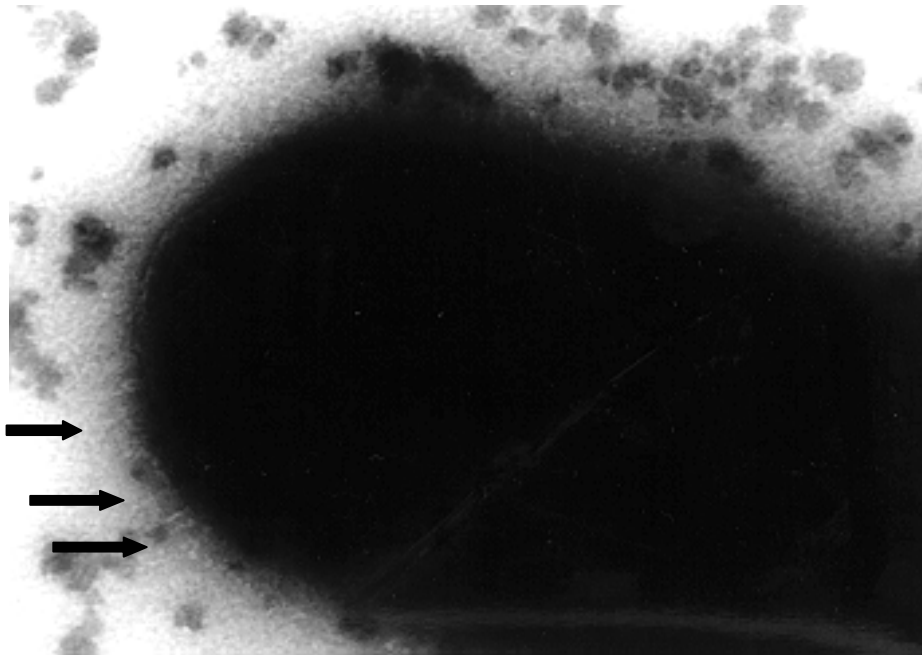


Figura 21. Microscopia Eletrônica de Transmissão (coloração negativa) da amostra S17-1 (transconjugante). Magnificação de 56000X. As setas indicam a presença de estruturas (fibrilas) na superfície bacteriana.

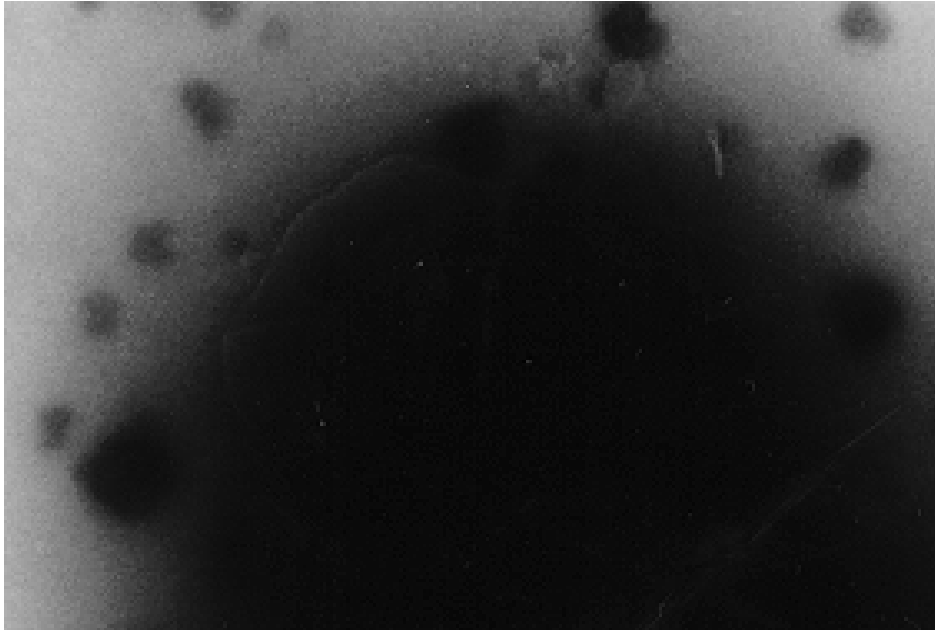


Figura 22. Microscopia Eletrônica de Transmissão (coloração negativa) da Mut.43. Magnificação de 56000X.

4.8- Microscopia Eletrônica de Varredura

Através da técnica da Microscopia Eletrônica de varredura, a adesão da linhagem S17 e a transconjugante S17-1 em células HEp-2, foi confirmada. Também, através dessa técnica, foi possível visualizarmos a possível invasão bacteriana ocorrendo (figuras 23A e 23C).

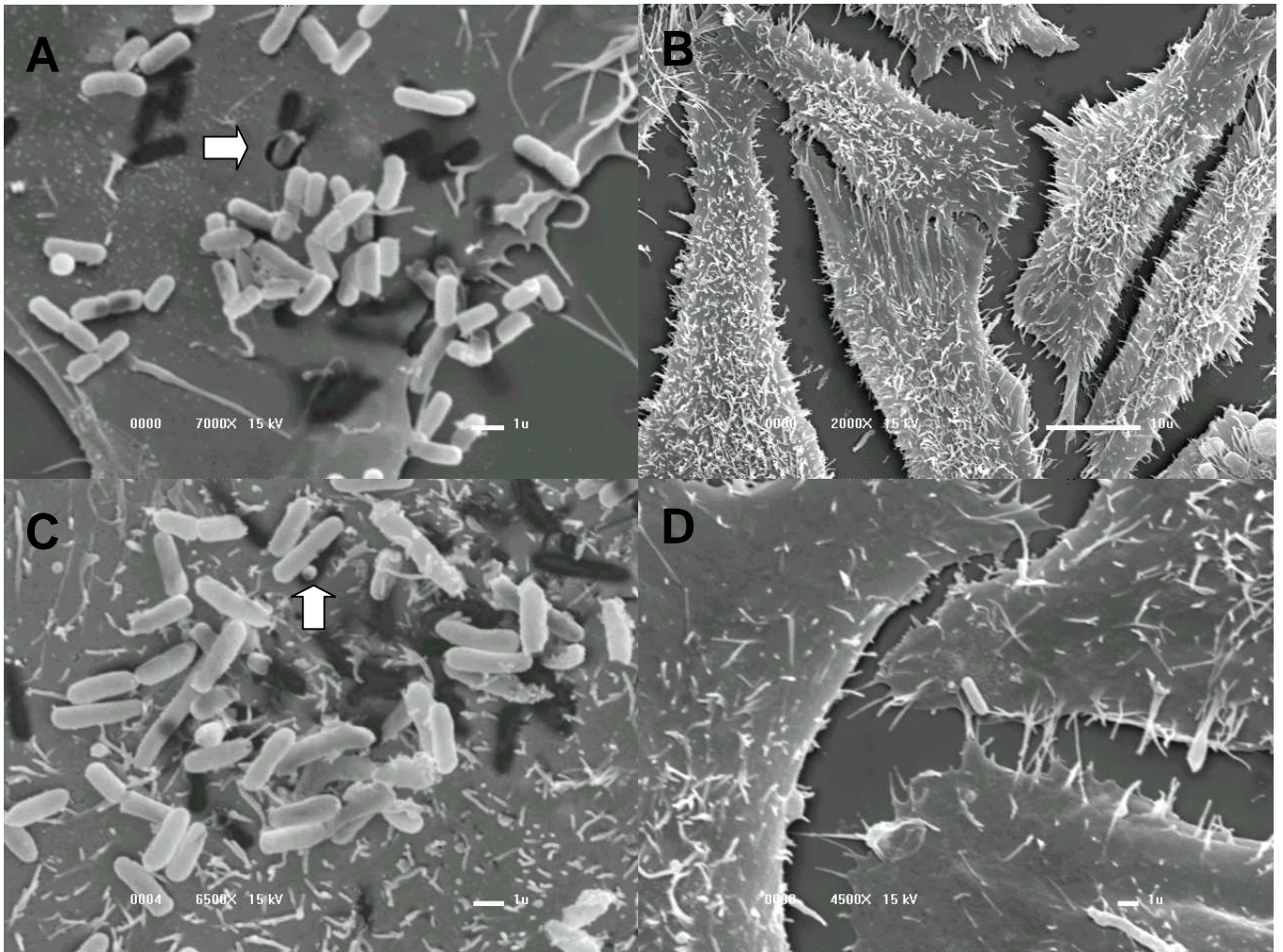


Figura 23. Fotos do teste de adesão e invasão em células HEp-2 das linhagens selvagens e da receptora HB101 através da técnica de “scanning electron microscopy” (SEM): (A) S17 (com manose); (B) HB101 (sem manose); (C) S17-1 transconjugante (com manose); (D) Mut.43 (sem manose). As setas indicam os pontos de invasão bacteriana.

4.9- Teste de “Fluorescence actin staining” (FAS)

Para o teste de FAS foram utilizadas as amostras S17-1 (transconjugante) e Mut.43, como também as linhagens S17 (selvagem) e HB101. O resultado do teste foi visualizado no microscópico de fluorescência e as fotografias encontram-se a seguir. Não foram observados pontos de alta fluorescência em nenhuma das amostras testadas, além daqueles observados na linhagem padrão (figura 24A), o que indica que não existe acúmulo de actina.

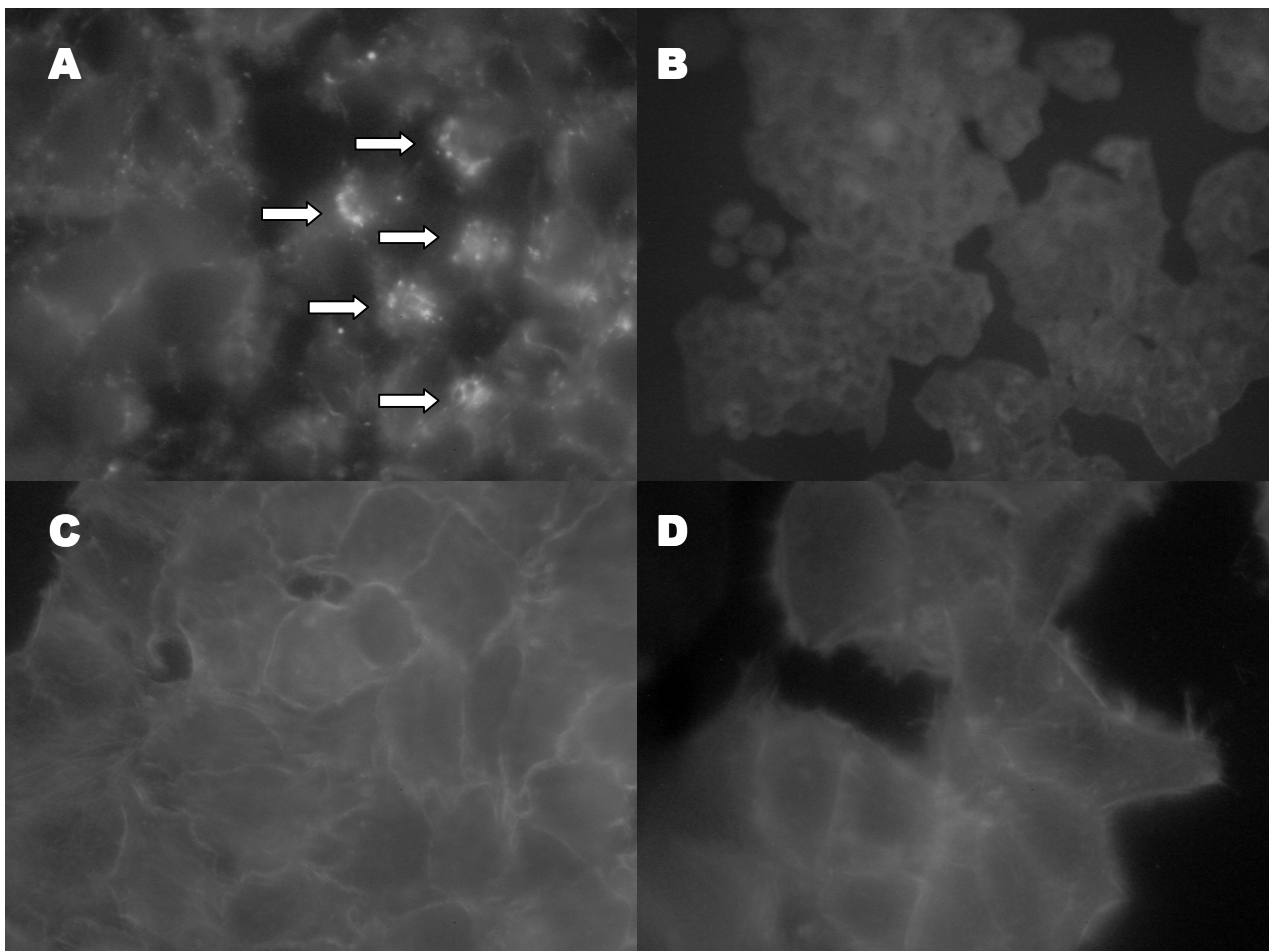


Figura 24. Fotos do teste de FAS da adesão com 6 horas (sem manose) em células HEp-2. **A:** Linhagem E2348/69 (controle positivo). **B:** Linhagem receptora HB101 (controle negativo). **C:** Linhagem S17 (selvagem). **D:** Amostra S17-1 (transconjugante). Magnificação de 600X. As setas indicam pontos de alta fluorescência (acúmulo de actina).

5- DISCUSSÃO

Esse trabalho foi desenvolvido, primordialmente, com a finalidade de se estudar possíveis diferentes mecanismos e genes de patogenicidade presentes em linhagens de *E. coli* patogênicas para aves (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). Antes de iniciarmos esses estudos, caracterizamos as linhagens existentes no Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana do DMI, através da técnica denominada REP-PCR, para verificar, através dessa técnica, se as mesmas pudessem ser agrupadas em grupos clonais de acordo com o tipo de doença que causavam em aves, como descrito por Silveira *et al.* (2002) com a técnica de ERIC-PCR, além de facilitar o processo de seleção inicial. Paralelamente a esse estudo, caracterizamos as diferentes linhagens quanto à possível presença de genes relacionados à patogenicidade, incluindo aí, as capacidades de adesão e invasão de culturas celulares (HEp-2 e HeLa) cultivadas *in vitro*, tornando-se essas capacidades o fator preponderante para o estudo posterior de determinadas linhagens.

Através da análise do dendrograma obtido com a técnica REP-PCR (figura 2), verificamos que o teste apresentou um grande poder discriminatório entre as linhagens, o que auxiliou na seleção das três amostras utilizadas nesse estudo. Da mesma maneira, a construção do dendrograma possibilitou a verificação da existência de 49 perfis distintos (genótipos quanto à técnica REP-PCR), dentro das 79 linhagens.

Embora o teste tenha apresentado um grande poder discriminatório, não foi possível agrupar as diferentes linhagens em grupos clonais de patogenicidade, isto é, não foi possível demonstrar que as linhagens causadoras de determinado tipo de patogenicidade (septicemia, onfalite, cabeça inchada) e comensais apresentam um padrão genotípico de semelhança. Dessa maneira, concluímos que essa técnica, apesar de separar as linhagens em grupos clonais genotípicos, não é discriminatória quanto à separação em grupos de patogenicidade como anteriormente descrito para a técnica ERIC-PCR (Silveira *et al.*, 2002).

Levando-se em consideração que o processo infeccioso causado por amostras APEC pode requerer a habilidade da bactéria, de inicialmente, aderir às células do trato respiratório, sendo essa adesão mediada por adesinas (fimbriais ou afimbriais) (Gyimah & Panigraphy, 1988; Dozois *et al.*, 1992; Fantinatti *et al.*, 1994; Pourbakhsh *et al.*, 1997; La Ragione *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2002a; Stehling *et al.*, 2003a; Stehling *et al.*, 2003b; Campos *et al.*, 2005), iniciamos a caracterização de algumas de nossas linhagens [S17 (septicemia), S21

(septicemia) e SCI10 (síndrome da cabeça inchada)] pela determinação de suas capacidades de adesão e invasão de culturas celulares cultivadas *in vitro* (HeLa e HEp-2).

Dessa maneira, verificamos que as linhagens descritas são capazes de apresentar adesão e invasão das culturas celulares citadas. As capacidades de adesão e invasão foram, de início, observadas através de microscopia óptica (figura 3). Através da microscopia óptica a capacidade de adesão é perfeitamente factível de ser determinada, porém, a capacidade de invasão pode deixar dúvidas, uma vez que essa é caracterizada apenas pela presença de um possível halo claro ao redor de bactérias na superfície celular (figura 3B). Por esse motivo, realizamos, também, a microscopia de varredura eletrônica (figura 23) e o teste de invasão utilizando placas de petri com meios seletivos (contagem de colônias).

Nossos resultados de adesão confirmam trabalhos previamente publicados que demonstraram a presença da capacidade de expressão de possíveis fímbrias em linhagens celulares em diferentes linhagens APEC (Fantinatti *et al.*, 1994; Silveira *et al.*, 2002a; Stehling *et al.*, 2003a; Stehling *et al.*, 2003b; Campos *et al.*, 2005) e em outras linhagens de *E. coli* patogênicas para humanos e/ou animais (Nataro & Kaper, 1998), sendo essa expressão dependente de temperatura e/ou tipo de meio de cultura (Dho & Lafont, 1984; Provence & Curtiss III, 1994; Campos *et al.*, 2005).

Vários trabalhos descritos na literatura demonstraram que linhagens APEC podem apresentar, além de genes relacionados à capacidade de expressão de fímbria, outros genes possivelmente relacionados à patogenicidade (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999, La Ragione & Woodward, 2002; Campos *et al.*, 2005).

Assim, com a finalidade de melhor caracterizarmos essas linhagens bacterianas, determinamos, nas mesmas, por PCR, a possível presença de plasmídios e dos genes descritos na Tabela IV.

Desta maneira, verificou-se que a linhagem S17 possui um plasmídio com peso molecular de aproximadamente 70 MDa, enquanto que as linhagens S21 e SCI10 possuem plasmídios de 30 MDa e 120 MDa, respectivamente.

Vários trabalhos descritos na literatura demonstram a presença de plasmídios de baixo e alto peso molecular em linhagens APEC (Fantinatti *et al.*, 1994; Provence & Curtiss III, 1994; Dozois *et al.*, 2000; Stehling *et al.* 2003a; Stehling *et al.* 2003b), sendo que muitos desses plasmídios possuem genes que podem estar relacionados aos processos de

patogenicidade presentes nessas linhagens (Provence & Curtiss III, 1994; Dozois *et al.*, 2000; Stheling *et al.* 2003a). Animais comerciais, sob condições de crescimento intensivo, possuem em suas rações fatores de crescimento que promovem o desenvolvimento uniforme destes animais. Entre os fatores de crescimento presentes nas rações das aves, encontram-se substâncias antimicrobianas, bactericidas ou bacteriostáticas, denominadas antibióticos. A presença destas substâncias na ração faz com que elementos genéticos móveis, como os plasmídios, sejam mantidos e transferidos de maneira horizontal entre populações bacterianas (Eberhard, 1990). Casos estes plasmídios possuam, além dos genes determinantes de resistência a antibióticos, outros genes que poderiam estar relacionados aos processos de patogenicidade das linhagens APEC, a tendência é a manutenção dos mesmos nas linhagens patogênicas.

Assim, a presença de plasmídio(s) em uma dada linhagem bacteriana patogênica pode indicar, no(s) mesmo(s), a possível presença de genes relacionados à patogenicidade presentes nesta linhagem (Dozois *et al.*, 2000; Stheling *et al.*, 2003a; Stehling *et al.*, 2004). Podem estar incluídos nesses genes aqueles relacionados às capacidades de adesão e invasão celular, à sobrevivência no sistema circulatório e celular do hospedeiro (sistema de captação de ferro e destruição tissular), e entre outros.

Com essa finalidade, as três linhagens bacterianas patogênicas foram caracterizadas quanto à presença de genes para patogenicidade descritos na literatura, para linhagens APEC, ou outros tipos bacterianos, através da técnica de PCR, com o uso de iniciadores específicos.

Os resultados das técnicas demonstraram que as linhagens estudadas possuem a seguinte caracterização: S17 (*fimA*, *csgA*, *crl* e *lpfA*_{O157/OI-154}), S21 (*fimA*, *csgA*, *crl*, *tsh*, *iucA* e *lpfA*_{O157/OI-154}), SCI 10 (*fimA*, *csgA*, *crl*, *fepC* e *lpfA*_{O157/OI-154}).

A conjugação destas amostras com uma linhagem receptora não patogênica (HB101), incapaz de aderir e invadir linhagens celulares cultivadas *in vitro*, na presença e ausência do açúcar D-manose, demonstrou a transferência dos plasmídios de 70 MDa, 30 MDa e 120 MDa, presentes, respectivamente, nas linhagens S17, S21 e SCI10.

A posterior análise dos transconjugantes selecionados demonstrou que os transconjugantes S17-1 (S17 x HB101), S21-1 (S21 x HB101) e SCI10-1 (SCI10 x HB101) apresentaram as características descritas abaixo.

As capacidades de adesão e invasão presentes nas linhagens S17 e sua trasconjugante (HB101, como linhagem receptora) pode ser creditada à presença do plasmídio de 70 MDa transferido, conforme resultados anteriormente descritos. Esses dados são parcialmente corroborados por trabalhos previamente publicados por nosso grupo (Stehling *et al.*, 2003a; Stehling *et al.*, 2003b), utilizando-se outras linhagens de APEC, onde, pelo menos a capacidade de adesão mostrou-se ser mediada por plasmídios. Como a adesão observada não é bloqueada pela presença do monossacarídeo D-manose concluímos que a mesma não é mediada por fímbria Tipo 1, ou fímbrias Tipo 1-“like”, a qual acredita-se ser responsável pela adesão inicial em células de traquéia (La Ragione *et al.*, 2000). Da mesma maneira, a presença positiva do gene *lpfA*_{O157/O1-154}, através da técnica de PCR na linhagem selvagem S17 (*fimA*, *crl* e *lpfA*_{O157/O1-154}), e sua ausência na linhagem recombinante, demonstra que, além da fímbria *lpfA*_{O157/O1-154} ser codificada por genes cromossômico na linhagem S17, ela, também, não é responsável pelo processo de adesão. Também, devido aos resultados obtidos pela PCR, para os genes *csfA* e *crl*, acreditamos que as fímbrias “curli” não estão diretamente relacionadas neste processo de adesão, pois apesar da presença do gene estrutural em todas as linhagens (inclusive na HB101), não foi verificada a presença do gene *crl* nas trasconjugantes. Todos estes dados indicam que uma nova adesina, ainda não descrita na literatura, pode estar presente no plasmídio de 70 MDa.

Em relação às linhagens S21 e SCI 10, seus trasconjugantes não apresentaram adesão em ambas os tipos celulares. Com isso, acreditamos que genes destas linhagens relacionados ao processo de adesão estão localizados no cromossomo, ou ainda, podem estar localizados no plasmídio transferido, com controle em genes cromossômicos. Outros estudos se fazem necessários para confirmar estas hipóteses.

Também, através do teste de PCR para o gene *eae* demonstramos que a proteína intimina, comum nos processos de patogenicidade de linhagens de *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) (Donnenberg & Kaper, 1992) e enterohemorrágicas (EHEC) (Nataro & Kaper, 1998), não está relacionada ao processo de adesão e/ou invasão dessas linhagens.

Como o plasmídio transferido da linhagem S17 para a receptora está relacionada ao processo de adesão em culturas HEp-2 e HeLa, a amostra trasconjugante (S17-1) foi mutagenizada utilizando o transposon TnphoA (pRT 733) (Taylor *et al.*, 1989) e foi verificada que determinadas colônias obtidas dessa mutagenização perderam a capacidade de adesão em

ambos os tipos celulares, o que leva a crer que o transposon possa ter se inserido em gene(s) do responsável(eis) pelo processo de adesão. Essa transposição do TnphoA no plasmídio foi confirmada através da análise do perfil plasmidial dessas amostras mutantes quando comparadas com o perfil da transconjugante (figura 15). Desse modo, a provável mutação ocorrida no plasmídio transferido, levando à abolição da característica de adesão, indica que o mesmo está relacionado ao processo de adesão nessas culturas celulares e, conseqüentemente, parte da patogênese dessa amostra.

Levando em conta que prováveis novas adesinas possam estar localizadas nos pontos de inserção do transposon TnphoA, e que a seqüência do transposon é conhecida, futuros estudos, com seqüenciamento de DNA, em relação às amostras mutantes (Mut. 43 e Mut.48) poderão esclarecer sobre a presença de genes de virulência e prováveis novas adesinas envolvidas no processo de adesão dessa linhagem.

A partir desses resultados iniciais, o estudo foi direcionado principalmente para a linhagem S17 e suas derivadas, a fim de identificarmos a presença de prováveis novas adesinas e/ou mecanismos de patogenicidade que possam estar envolvidos nesse processo.

Através da observação, em microscópio eletrônico, de estruturas localizadas na superfície bacteriana das amostras transconjugantes da S17, e a ausência dessas na receptora, que o plasmídio transferido esteja relacionada à presença dessas estruturas (prováveis adesinas), e reforça a idéia de que esse plasmídio esteja mesmo envolvido no processo de adesão em culturas de HEp-2 e HeLa. O fato da amostra mutante não apresentar essas estruturas na superfície bacteriana, também pode comprovar que a inserção do transposon TnphoA realmente ocorreu numa região do plasmídio responsável pelo processo de adesão nessas culturas celulares. Desse modo, a Microscopia Eletrônica de Transmissão (coloração negativa) demonstrou que prováveis novas adesinas codificadas por genes localizados nesse plasmídio, podem estar envolvidos nesse processo.

O gel de proteínas de superfície da linhagem S17 e de suas derivadas (figura 18/canaletas 5 e 8) demonstrou que algumas proteínas variando entre 60 a 90 KDa, encontradas na amostra transconjugante, e ausentes na receptora HB101, estão relacionados à presença do plasmídio transferido, podendo estar relacionadas ao processo de adesão e invasão dessa linhagem. Também, a análise do gel de proteínas da linhagem S17 e da Mut.43 em diferentes meios (LA, BHI ágar, TSA, Minca ágar e Ágar Sangue), demonstra a existência

de algumas proteínas (figura 19/canaletas 6 e 10, e figura 20/canaletas 2 e 3) na linhagem transconjugante S17-1 e ausência na mutante, sugerindo que a síntese dessas proteínas possa ter sido interrompida pela transposição do TnpHoA. Esses dados são indicativos que as mesmas possam estar relacionadas ao processo de adesão e/ou invasão da linhagem S17. Também foi verificado que a expressão dessas proteínas é dependente do tipo de meio de cultura utilizado, e o meio que apresentou melhores resultados para a análise de prováveis proteínas envolvidas nesses processos de patogenicidade foi o TSA (figura 19/canaleta 10). Assim, acreditamos que as proteínas relacionadas à adesão sejam melhores expressas nesse tipo de meio.

Acreditamos que o processo de invasão é posterior ao de adesão e, portanto, as considerações acima realizadas para a adesão também se aplicam à invasão.

Além da confirmação das adesões da linhagem S17 e de sua transconjugante S17-1 em células HEp-2, outro objetivo do uso da técnica de SEM, foi a de visualizar como de fato ocorre a interação entre a bactéria e as células hospedeiras (HEp-2).

Através das fotografias do SEM, o processo de adesão nas células HEp-2 foi confirmado. Verificou-se, também, através de SEM, a presença de depressões características existentes na superfície celular em locais aonde existem bactérias, ou em locais onde estas bactérias não mais estão presentes. Em alguns pontos é possível observar a presença de bactérias com praticamente todo o seu corpo celular dentro da membrana celular da célula HEp-2 (Figuras 23A e 23C).

Com a finalidade de estudarmos de maneira mais completa os processos de adesão e invasão, também, o processo de adesão foi analisado através da técnica de FAS (Knutton *et al.*, 1989), a qual demonstra um modelo de adesão padrão típico de rearranjos de actina presentes em outros tipos bacterianos (Donnenberg *et al.*, 1992; Nataro & Kaper, 1998).

As fotografias do teste de FAS mostraram que durante o processo de adesão e/ou invasão, não ocorre acúmulo de actina (rearranjo estrutural) comum em algumas lesões características do epitélio, como o fenômeno A/E de linhagens de EPEC, EHEC e outras linhagens bacterianas (Donnenberg *et al.*, 1992; Nataro & Kaper, 1998). Também não foi observado alterações significativas no citoesqueleto das células HEp-2, o que demonstra que a patogenicidade dessas linhagens não está relacionada à presença de substâncias citotóxicas

(toxinas). Esses resultados indicam que este tipo de adesão e, conseqüentemente, invasão pode representar um novo modelo ainda não descrito.

Baseado nos resultados do teste de invasão (contagem de colônias em placas com meio seletivo), do SEM, do FAS e do PCR (ausência de genes de invasão, como o *inv* de *Shigella* spp., *ial* de EIEC, *invA* de *Salmonella* spp. e *ibeA* de *E. coli* causadora de meningite) da linhagem S17 e suas derivadas, reforçam a hipótese de um modelo de adesão e/ou invasão diferente.

Alguns estudos (Dho & Lafont, 1984; Ike *et al.*, 1992) demonstraram a existência da correlação entre a capacidade de crescimento de linhagens APEC em condições limitadas de ferro e a patogenicidade.

Em nosso estudo alguns genes (*fyuA*, *irp-2*, *iucA*, *fepC* e *sitA*) do sistema de aerobactina foram pesquisados entre as linhagens de APEC (S17, S21 e SC10) e suas derivadas. Apenas os genes *iucA* e *fepC* foram identificados, respectivamente nas linhagens S21 e SC10, e não nas linhagens recombinantes (aonde estas últimas ocorreram). A presença do gene *fepC* foi descrita como sendo relacionada à presença de ilhas de patogenicidade em linhagens de *E. coli* uropatogênicos (Ye & Xu, 2001). Nossos resultados confirmam que estas ilhas de patogenicidade são de origem cromossômica podendo representar um mecanismo de patogenicidade diferente daquele descrito para os processos de adesão e invasão presentes na linhagem S17, e por isso, deverão ser posteriormente estudados.

Adicionalmente a estes dados, Provence & Curtis (1994) quando identificaram a proteína denominada TSH, com capacidade de aglutinar eritrócitos de galinha, sugeriram que a mesma deveria ser responsável pela capacidade de aderir aos eritrócitos hospedeiro e que poderia, também, atuar como uma importante adesina nos estágios iniciais da colonização do epitélio do trato respiratório das aves. Além disso, Dozois *et al.* (2000) demonstraram que um plasmídeo ColV podem apresentar o gene *tsh*. Este plasmídeo também têm sido associado à presença de genes do sistema de aerobactina (Waters & Crosa, 1991).

Em nosso caso, o gene *tsh*, identificado através do teste de PCR, somente na linhagem S21, não foi encontrado nas amostras transconjugantes, o que indica, portanto, que nesta linhagem este gene não está localizado no plasmídeo transferido, ou seja, ao contrário de alguns estudos (Dozois *et al.*, 2000; Stehling *et al.*, 2003; Tivendale *et al.*, 2004) o gene não é plasmídeo-mediado, pelo menos na linhagem S21. Assim, considerando-se que os

transconjugantes desta linhagem não aderem e invadem as células HeLa e HEp-2, existe a possibilidade deste gene estar envolvido nos processos de adesão e invasão na linhagem S21.

Da mesma maneira, devido ao número relativamente grande de genes, presentes na linhagem S21 (*tsh*, *fimA*, *csgA*, *crl*, *lpfA*_{O157/O1-154} e *iucA*), acreditamos que exista na mesma uma ou mais, ilhas de patogenicidade de origem cromossômica. Esse fato deverá ser posteriormente estudado.

Alguns estudos têm, também, considerado a presença de plasmídios colicinogênicos, como sendo um fator adicional de virulência em linhagens APEC (La Ragione & Woodward, 2002), principalmente em relação a colicina V (plasmídio ColV). Em nosso estudo, nenhuma das três linhagens (S17, S21 e SCI10) produziram a colicina V. Conseqüentemente, esta colicina não está envolvida no processo de patogenicidade dessas linhagens. Outros estudos (Quakenbusch & Falkow, 1979; Milch *et al.*, 1979) também demonstraram que linhagens de *E. coli* não produtoras desta colicina, mas que possuem plasmídios de alto peso molecular, apresentaram-se virulentas quando testadas em modelo animal. Dessa forma, acreditamos que a presença da colicina V não é um determinante de virulência de linhagens APEC, pois duas linhagens utilizadas no nosso estudo (S17 e S21) isoladas de aves com quadro clínico de septicemia não produzem colicinas, mas apresentaram adesão e invasão em culturas celulares. Dessas três linhagens, somente a SCI10, apresentou produção de colicinas (Ia, Ib, E1, E3, B e K), sendo essa característica transferida para seus transconjugantes. Esses transconjugantes não apresentaram adesão e/ou invasão de linhagens celulares cultivadas *in vitro*, embora produzissem as colicinas citadas. Esse fato corrobora nossas observações de que a produção de colicina *per se* não é um fator de patogenicidade.

6- CONCLUSÕES

6.1- Genes de adesão e invasão da linhagem S17, que podem participar da patogenicidade de linhagens APEC, são plasmídio-mediado. Já os genes de adesão e invasão das linhagens S21 e SCI10 estão localizados no cromossomo bacteriano.

6.2- Genes de aerobactina identificados nas linhagens S21 e SCI10 também estão localizados no cromossomo bacteriano (não plasmídio-mediado).

6.3- A produção de colicinas da linhagem SCI10 está relacionada ao plasmídio transferido (120 MDa).

6.4- O gene *tsh*, ao contrário de diversos estudos (Dozois *et al.*, 2000; Stehling *et al.*, 2003; Tivendale *et al.*, 2004), não foi plasmídio-mediado na linhagem S21, ou seja, esse gene está localizado no cromossomo bacteriano.

6.5- O gene *tsh* e outros genes (*iucA*, *fimA*, *crl*, *lpfA*_{O157/O1-154} e *csgA*) identificados na linhagem S21 podem estar localizados dentro de uma ilha de patogenicidade.

6.6- A maneira de como a linhagem S17 e suas transconjugantes invadem as células HEp-2 é diferente dos mecanismos de invasão descritos para outras linhagens de *E. coli*.

6.7- O teste de REP-PCR utilizado no estudo, embora tenha demonstrado boa capacidade de discriminação genotípica entre as linhagens estudadas, não foi eficiente para discriminar as linhagens patogênicas das não patogênicas, quando comparada com outras técnicas, como o ERIC-PCR.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S.N.; GOGUEN, J.D. & BEACHEY, E.H. – 1988. Hyperadhesive mutant of type 1-fimbriated associated with formation of FimH organelles (Fimbriosomes). *Infect. Immun.* 56: 1023-1029.

ACTHMAN, M.; HEUZENROEDER, M.; KUSECEK, B.; OCHMAN, H.; CAUGANT, D.; SELANDER, R.K.; VAISANEN-RHEN, V.; KORHONEN, T.K.; STUART, S; ØRSKOV, F. & ØRSKOV, I. – 1986. Clonal analysis of *Escherichia coli* O2:K1 isolated from diseased humans and animals. *Infect. Immun.* 51: 268-276.

ARNQVIST, A.; OLSEN, A.; PFEIFER, J.; RUSSELL, D.G. & NORMARK, S. – 1992. The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. *Mol. Microbiol.* 6: 2443-2452.

ARNS, C.W. & HAFEZ, H.M. – 1992. Swollen head syndrome in poultry in Brazil. Proc. of the Western Poultry Dis. Conference, Sacramento, USA, pp. 81-84.

AZEVEDO, J.L. & DA COSTA, S.O.P. – 1973. In: Exercícios práticos da genética. Companhia Editora Nacional, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, pp. 171-174.

BABAI, R.; BLUM-OEHLER, G.; STERN, B.E.; HACKER, J. & RON, E.Z – 1997. Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 149: 99-105.

BENJAMIN, P.; FEDERMAN, M. & WANKE, C.A. – 1995. Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63: 3417-3421.

BERKHOFF, H.A. & VINAL, A.C. – 1986. Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive *Escherichia coli* for poultry. *Avian Dis.* 30: 117-121.

BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J. – 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

BJURSTROM, L. – 1993. Aerobic bacteria occurring in the vagina of bitches with reproductive disorders. *Acta Vet. Scand.* 34: 29-34.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J.E. & RAMOS, J. – 1993. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1446-1451.

BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; MORA, A. & BLANCO, J. – 1997. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with *in vivo* pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2953-2957.

- BLOM-POTAR, M.C; DAVID, H.L & RASTOGI, N. – 1989. Isoenzymes as tools to discriminate various subdivisions in the *Mycobacterium fortuitum* complex. *Acta Leprol.* 7: 39-43.
- BOYER, H.W. & ROULLAND-DUSSOIX, D. – 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
- BRIAN, M.J.; VAN, R.; TOWNSEND, I.; MURRAY, B.E.; CLERAY, T.G. & PIECKERING, L.K. – 1993. Evaluation of the molecular epidemiology of an outbreak of multiply resistant *Shigella sonnei* in a day-care center by using pulsed-field gel electrophoresis and plasmid DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2152-2156.
- BURKE, W.H. – 1988. Avian reproduction (egg formation and embryo development). Rio de Janeiro, Guanabara, pp. 853-862.
- CAMPOS, T.A., STEHLING, E.G., FERREIRA, A., PESTANA DE CASTRO, A.F., BROCCHI, M., SILVEIRA, W.D. – 2005. Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 106, 275-285.
- CAVÉ, H.; BINGEN, E.; ELION, J. & DENAMUR, E. – 1994. Differentiation of *Escherichia coli* strains using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Res. Microbiol.* 145: 141-50.
- CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; & BINGEN, E. – 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4555-4558.
- COBERTT, W.T.; BERKHOFF, H.A. & VINAL, A.C. – 1987. Epidemiological study of the relationship between Congo red binding *Escherichia coli* and avian colisepticemia. *Can. J. Vet. Res.* 51: 312-315.
- COLLINSON, S.K.; DOIG, P.C.; DORAN, J.L.; CLOUTHIER, S.; TRUST, T.J. & KAY, W.W. – 1993. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J. Bacteriol.* 175:12-18.
- DALLA-COSTA, L.M.; IRINO, K.; RODRIGUES, J.; RIVERA, I.N.G. & TRABULSI, L.R. – 1998. Characterization of diarrhoeagenic *Escherichia coli* clones by ribotyping and ERIC-PCR. *J. Med. Microbiol.* 47: 227-234.
- DHO, M. & LAFONT, J.P. – 1984. Adhesive properties and iron uptake ability in *E. coli* lethal and non-lethal for chicks. *Avian Dis.* 28: 1016-1025.
- DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; DESATEULS, C. & FAIRBROTHER, J. – 1997. Relationship between presence of the *tsh* and *csgA* genes and virulence in avian *Escherichia coli*. Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology, 4-8 May, Miami Beach, FL, American Society for Microbiology, pp. 75.

- DHO-MOULIN, M. & FAIRBROTHER, J.M. – 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30: 299-316.
- DONNENBERG, M.S. & KAPER, J.B. – 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60: 3953-3961.
- DOZOIS, C.M.; FAIRBROTHER, J.M.; HAREL, J. & BOSSÉ, M. – 1992. *pap*- and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect. Immun.* 60: 2648-2656.
- DOZOIS, C.M.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; FAIRBROTHER, J.M.; DESAUTELS, C. & CURTISS III, R. – 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the genetic region. *Infect. Immun.* 68: 4145-4154.
- DRASAR, B.S. & HILL, M.J. – 1974. Human intestinal flora. Academic Press, Ltd., London, Unidet Kingdom, pp. 36-43.
- EBERHARD, W.G. – 1990. Evolution in bacterial plasmids and levels of selection. *Quarterly Rev. Biol.* 65: 3-22.
- ELFADIL, A.A.; VAILLANCOURT, J.P.; MEEK, A.H., JULIAN, R.J. & GYLES, C.L. – 1996. Description of cellulitis lesions and associations between cellulitis and other categories of condemnation. *Avian Dis.* 40: 690-698.
- EMERY, D.A.; NAGARAJA, K.V.; SHAW, D.P.; NEWMAN, J.A. & WHITE, D.G. – 1992. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chicken and turkeys. *Avian Dis.* 36: 504-511.
- FANTINATTI, F.; SILVEIRA, W.D & CASTRO, A.F.P. – 1994. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicemic *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 41: 75-86.
- FERNÁNDEZ, L.A. & BERENQUER, J. – 2000. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 21-44.
- FOSTER, G.; ROSS, H.M.; PENNYCOTT, T.W.; HOPKINS, G.F. & McLAREN, I.M. – 1998. Isolation of *Escherichia coli* O86:K61 producing cyto-lethal distending toxin from wild birds of the finch family. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 395-398.
- GANNON, V.P.J.; RASHED, M.; KING, R.K. & THOMAS, E.J.G. – 1993. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1268-1274.
- GERMON, P.; CHEN, Y.H.; HE, L.; BLANCO, J.E.; BRÉE, A.; SCHOULER, C.; HUANG, S.H. & MOULIN-SCHOULER, M. – 2005. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol.* 151: 1179-1186.

- GIBSON, F. & MAGRATH, D.I. – 1969. The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62-I. *Biochem. Biophys. Acta.* 152: 175-184.
- GOPHNA, U.; OELSCHLAEGER, T.A.; HACKER, J. & RON, E.Z. – 2001. *Yersinia* HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. *FEMS Microbiol. Lett.* 196: 57-60.
- GROSS, W.B. – 1961. The development of air sac-disease. *Avian Dis.* 5: 431-439.
- GROSS, W.B. – 1991. Colibacillosis, In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; REID, W.M. & YODER, J.H.W. (Eds.), *Disease of poultry*, 9th ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 138-144.
- GYLES, C.L. – 1994. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, UK, pp. 237-259.
- GYMAH, J.E. & PANIGRAPHY, B. – 1988. Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of pathogenic *Escherichia coli* to chicken tracheal epithelium. *Avian Dis.* 32: 74-78.
- HAMES, B.D. & RICKWOOD, D. – 1982. *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach.* IRL Press Limited, England.
- HAMMAR, M.; ARNQVIST, A.; BIAN, Z.; OLSEN, A. & NORMARK, S. – 1995. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin and Congo red binding curli polymers in *Escherichia coli* K12. *Mol. Microbiol.* 18: 661-670.
- HARDY, K.G. – 1975. Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.* 39: 464-515.
- HOFFMAN, V. – 1968. *Anatomia e fisiologia de la saves domesticas.* Zaracosa, Acribia, pp. 68.
- HULL, R.A.; GILL, R.E.; HSU, P.; MINSHEW, B.H. & FALKOW, S. – 1981. Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect. Immun.* 33: 933-938.
- HULTON, C.S.J., HIGGINS, C.F. & SHARP, P.M. – 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5: 825-834.
- IKE, K; KAWAHARA, K; DANBARA, H & KUME, K. – 1992. Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid. *J. Vet. Med. Sci.* 54: 1091-1098.

- JANßEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILLIP, H.C. & WIELER, L.H. – 2001. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 291: 371-378.
- JANN, K. & JANN, B.J. – 1997. Capsules of *Escherichia coli*, In: SUSSMAN, M. (ed.) *Escherichia coli: Mechanisms of virulence*, Cambridge University Press, pp. 113-143.
- JORDAN, T.T.W. & PATTISON, M. – 1996. Colisepticaemia. In: *Poultry diseases*, 4 th ed. Cambridge University Press, pp. 39-41.
- KALLENIUS, G.; MOLLBY, R.; SVENSON, S.B.; WINBERG, J. & HULTBERG, H. – 1980. Identification of a carbohydrate receptor recognized by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection* 8: 288-293.
- KARCH, H.; SCHUBERT, S.; ZHANG, D.; ZHANG, W.; SCHMIDT, H.; OLSCHLAGER, T. & HACKER, J. – 1999. A genomic island, termed high pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect. Immun.* 67: 5994-6001.
- KAUFFMANN, F. – 1947. The serology of the *coli* group. *J. Immunol.* 57: 71-100.
- KITAJIMA, E.W; DOLDER, M.A.H. & JOAZEIRO, P.P. – 1999. Apostila de microscopia eletrônica de varredura. Campinas, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- KNUTTON, S.; BALDWIN, T.; WILLIAMS, P.H. & McNEISH, A.S. – 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57: 1290-1298.
- LA RAGIONE, R.M.; COOLEY, W.A. & WOODWARD, M.J. – 2000. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *J. Med. Microbiol.* 49: 327-338.
- LA RAGIONE, R.M. & WOODWARD, M.J. – 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet. Sci.* 73: 27-35.
- LATHAM, R.H. & STAMM, W.E. – 1994. Role of fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections in adult women: correlation with localization studies. *J. Infect. Dis.* 149: 835-840.
- LE BOUGUENEC, C. ; ARCHAMBAUD, M. & LABGINE, A. – 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1189-1193.
- LEVINE, M.M. – 1984. *Escherichia coli* infections. In: *Bacterial vaccines*, cap. 7. London, Academic Press, pp. 187-235.

- LEVINE, M.M. – 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155: 377-389.
- LINDBERG, F.; TENNENT, J.M.; HULTGREN, S.J.; LUND, B. & NORMARK, S. – 1989. *papD*, a periplasmatic transport protein in P-pilus biogenesis. J. Bacteriol. 171: 6052-6058.
- LINGGOOD, M.A.; ROBERTS, M.; FORD, S.; PARRY, S.H. & WILLIAMS, P.H. – 1987. Incidence of the aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. J. Gen. Microbiol. 133: 835-842.
- LIU, P.Y.; LAU, Y.J.; HU, B.S.; SHYR, J.M.; SHI, Z.Y.; TSAI, W.S.; LIN, Y.H. & TSENG, C.Y. – 1995. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. J. Clin. Microbiol. 33: 1779-83.
- MARC, D. & DHO-MOULIN, M. – 1996. Analysis of the *fim* cluster of an avian O2 strain of *Escherichia coli*: serogroup-specific sites within *fimA* and nucleotide sequence of *fimI*. J. Med. Microbiol. 44: 444-452.
- MAURER, J.J.; BROWN, T.P., STEFFENS, W.L. & THAYER, S.G – 1998. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 42: 106-118.
- MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C.M.; CURTISS III, R.; BROWN, P.K.; ARNÉ, P.; BRÉE, A; DESAUTELS, C. & FAIBROTHER, J.M. – 2003. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. Infect. Immun. 71: 536-540
- MILCH, H.; NIKOLNIKOV, S. & CZIRÓK, E. – 1984. *Escherichia coli* col V plasmids and their role in pathogenicity. Acta Microbiol Hung. 31: 117-125.
- MILLER, J.H. – 1972. Experiments in molecular biology. Cold Spring Harbor Lab. Press.
- MOL, O & OUDEGA, B. – 1996. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. 19: 25-52.
- MOON, H.W. – 1990. Colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals. Curr. Top Microbiol. Immunol. 151: 148-165.
- MORLEY, A.J. & THOMSON, D.K. – 1984. Swollen head syndrome in broiler chickens. Avian Dis. 28: 238-243.
- NATARO, J.P. & KAPER, J.B. – 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11: 142-201.

NGELEKA, M.; KWAGA, J.K.; WHITE, D.G.; WHITTAM, T.S.; RIDELL, C.; GOODHOPE, R.; POTTER, A.A. & ALLAN, B. – 1996. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect. Immun.* 64: 3118-3126.

NICHOLLS, L., GRANT, T.H & ROBINS-BROWNE, R.M. – 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 35: 275-288.

NOLAN, L.K; WOOLEY, R.E & COOPER, R.K. – 1992. Transposon mutagenesis used to study the role of complement resistance in the virulence of an avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Dis.* 36: 398-402.

NUNOYA, T.; TAJIMA, M.; IZUCHI, T.; TAKAHASHI, K.; OTAKI, T.; NAGASAWA, Y. & HAKOGI, E. – 1991. Pathology of a broiler disease characterized by the swollen head. *J. Vet. Med. Sci.* 53: 347-349.

O'BRIEN, A.D; THOMPSON, M.R.; CANTEY, J.R. & FORMAL, S.B. – 1977. Production of a *Shigella dysenteriae*-like toxin by pathogenic *Escherichia coli*. In: Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology. ASM. Washington, D.C., Abstr. B103.

O'BRIEN, A.D; LA VECK, G.D.; THOMPSON, M.R. & FORMAL, S.B. – 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 146: 763-769.

OKEKE, I.N.; SCALETSKY, I.C.A.; SOARS, E.H.; MACFARLANE, L.R. & TORRES, A.G. – 2004. Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 36-44.

OLSEN, A.; JONSSON, A. & NORMARK, S. – 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338: 652-655.

OLSEN, A.; ARNQVIST, A.; HAMMAR, M. & NORMARK, S. – 1993a. Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. *Infect. Agents Dis.* 2: 272-274.

OLSEN, A.; ARNQVIST, A.; HAMMAR, M.; SUKUPOLVI, S. & NOMARK, S. – 1993b. The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 7: 523-536.

ØRSKOV, I & ØRSKOV, F. – 1985. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *J. Hyg.* 95: 551-575.

OSEK, J. – 2000. Virulence factors and genetic relatedness of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhea. *Vet. Microbiol.* 71: 211-222.

OVERALL JR., J.C. – 1970. Neonatal bacterial meningitis. Analysis of predisposing factors and outcome compared with matched control subjects. *J. Pediat.* 76: 499-511.

PACHECO, A.B.F.; GUTH, B.E.C.; SOARES, K.C.C.; ALMEIDA, D.F. & FERREIRA, L.C.S. – 1997. Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup O6 isolates based on RAPD. FEMS Microbiol. Lett. 148: 255-260.

PARREIRA, V.R. & YANO, T. – 1998. Cytotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome (SHS). Vet. Microbiol. 62:111-119.

PARREIRA, V.R. & GYLES, C.L – 2003. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* a vacuolating autotransporter toxin. Infect. Immun. 71: 5087-5096.

PATTISON, M.; CHETTLE, N.; RANDALL, C.J. & WYETH, P.J. – 1989. Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. Vet. Rec.125: 229-231.

PECHERE, J.C. – 1985. Facteurs microbiologiques de pathogénicité l' exemple de *E. coli* in: Urologie Pathologie Infectieuse et parasitaire. S. Khoury, Masson, Paris, pp. 47-52.

PEETERS, J.E. – 1994. *Escherichia coli* infections in rabbit, cats, dogs, gats and horses. In: Gyles C. L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans, CAB International, Wallingford, pp. 261-283.

PELLUDAT, C.; RAKIN, A.; JACOBI, C.A.; SCHUBERT, S. & HEESEMANN, J. – 1998. The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica* organization and siderophore dependent regulation. J. Bacteriol. 180: 539-546.

PENNYCOTT, T.W.; ROSS, H.M.; McLAREN, I.M.; PARK, A.; HOPKINS, G.F. & FOSTER, G. – 1998. Causes of death of wild-birds of the family *Fringillidae* in Britain. Vet. Rec. 143: 155-158.

PESTANA DE CASTRO, A.F.; SERAFIM, M.B.; BRITO, J.R.F.; BARCELLOS, D.S.E.N. & COLLI, I.A.G. – 1984. Virulence factors present in cultures of *Escherichia coli* isolated from pigs in the region of Concordia, SC, Brazil. Pesq. Vet. Bras. 4: 109-114.

POURBAKHSH, S.A.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; MARTINEAU-DOIZÉ, B. & FAIRBROTHER, J.M. – 1997. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. Microb. Pathog. 22: 331-341.

PROVENCE, D.L. & CURTISS III, R. - 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Infect. Immun. 62: 1369-1380.

QUACKENBUSH, R.L. & FALKOW, S. – 1979. Relationship between colicin V activity and virulence in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 24: 562-564.

RASMUSSEN, H.N.; RASMUSSEN, O.F.; ANDERSEN, J.K. & , OLSÉN J.E. – 1994. Specific detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by two-step PCR using hot-start and DMSO. Mol. Cell. Probes 8: 99-108.

ROBINS-BROWNE, R.M.; TOKHI, A.M.; ADAMS, L.M.; WOOD, B.V.; MOISIDIS, A.V.; KREJANY, E.O. & O'GORMAN, L.E. – 1994. Adherence characteristics of attaching and effacing strains of *Escherichia coli* from rabbits. Infect. Immun. 62: 1584-1592.

RUNYEN-JANECKY, L.J.; REEVES, S.A.; GONZALES, E.G. & PAYNE, S.M. – 2003. Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. Infect. Immun. 71: 1919-1928.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring harbor Laboratory Press, NY, pp.1584.

SANSONETTI, P.J.; RYTER, A.; CLERC, P.; MAURELLI, A.T. & MOUNIER, J. – 1986. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. Infect. Immun. 51: 461-469.

SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M. & TRABULSI, L. R. – 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect. Immun. 45: 534-536.

SCHMIDT, H.; ZHANG, W.L.; HEMMRICH, U. S.; JELACIC, S.; BRUNDER, W.; TARR, P.I.; DOBRINDT, U.; HACKER, J. & KARCH, H. – 2000. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *selC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Infect. Immun. 69: 6863-6873.

SCHNAITMAN, C.A. – 1971. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. J. Bacteriol. 108: 545-552.

SCHUBERT, S.; RAKIN, A.; KARCH, H.; CARNIEL, E. & HEESEMANN, J. – 1998. Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. Infect. Immun. 66: 480-485.

SILVEIRA, W.D.S; FERREIRA, A.; BROCCHI, M.; HOLLANDA, L.M.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; YAMADA, A. T. & LANCELLOTTI, M. – 2002a. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. Vet. Microbiol. 85: 47-53.

SILVEIRA, W.D.; FERREIRA, A.; LANCELLOTTI, M.; BARBOSA, I.; LEITE, D.S.; PESTANA DE CASTRO, A.F. & BROCCHI, M. – 2002b. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. Vet. Microbiol. 89: 323-328.

SILVEIRA, W.D.; LANCELLOTTI, M.; FERREIRA, A.; SOLFERINI, V.N.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; STEHLING, E.G. & BROCCHI, M. – 2003. Determination of the clonal structure of avian *Escherichia coli* strains by ribotyping analysis. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health. 50: 63-69.

SMITH, H.W. & GYLES, C.L. – 1970. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. J. Med. Microbiol. 3: 387-401.

SMITH, H.W. – 1974. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with colicine V. J. Gen. Microbiol. 83: 95-111.

SOJKA, W.J. & CARNAGHAN, R.B.A. – 1961. *Escherichia coli* infection in poultry. Res. Vet. Sci. 2: 340-352.

STATHOPOULOS, C.; PROVENCE, D.L. & CURTISS III, R. – 1999. Characterization of the avian pathogenic hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease type family of autotransports. Infect. Immun. 67: 772-781.

STEHLING, E.G.; CAMPOS, T.A.; FERREIRA, A. & SILVEIRA, W.D. – 2003a. Adhesion and invasion characteristics of a septicemic avian *Escherichia coli* strain are plasmid mediated. J. Appl. Res. Vet. Med. 1: 27-36.

STEHLING, E.G.; YANO, T.; BROCCHI, M. & SILVEIRA, W.D. – 2003b. Characterization of a plasmid-encoded adhesin of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case swollen head syndrome (SHS). Vet. Microbiol. 95: 111-120.

STONE, G.G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; McVEY, S. & CHENGAPPA, M.M. – 1994. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. J. Clin. Microbiol. 32: 1742-1749.

SZALO, I.M.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; PIERARD, D.; BALL, H. & MAINIL, J. – 2002. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. Res. Microbiol. 153: 653-658.

TARR, C.L.; LARGE, T.M.; MOELLER, C.L.; LACHER, D.W.; TARR, P.I.; ACHESON, D.W. & WHITTAM, T.S. – 2002. Molecular characterization of a serotype O121:H19 clone, a distinct Shiga toxin-producing clone of pathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 70: 6853-6859.

TAYLOR, R.K.; MANOIL, C. & MEKALANOS, J.J. – 1989. Broad-host-range vectors for delivery of *TnphoA*: use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 171: 1870-1878.

TIVENDALE, K.A.; ALLEN, J.L.; GINNS, C.A.; CRABB, B.S. & BROWNING, G.F. – 2004. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 72: 6554-6550.

- TOMA, C.; ESPINOSA, E.M; SONG, T.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; IYODA, S.; MIWANAGA, M. & RIVAS, M. – 2004. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 42: 4937-4946.
- TRUSCOTT, R.B. – 1973. Studies on the chick-lethal toxin of *Escherichia coli*. Can. J. Comp. Med. 37: 375-381.
- VAN DEN BOSCH, J.F; HENDRIKS, J.H.I.M.; GLADIGAU, I.; WILLEMS, H.M.C.; STORM, P.K. & DE GRAFF, F.K. – 1993. Identification of F11 fimbriae in chicken *Escherichia coli* strains. Infect. Immun. 61: 800-806.
- VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P.W.M.; HASS, P.E.W.; SOLL, D.R. & VAN EMBDEN, J.D.A. – 1991. The occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 29: 2578-2586.
- VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. & LUPSKI, J. R. – 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19: 6823-6831.
- WATERS, V.L. & CROSA, J.H. – 1991. Colicin V virulence plasmids. Microbiol. Rev. 55: 437-450.
- WILLIAMS, P.H. – 1979. Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 26: 925-932.
- WILLIAMS, P.H. & GRIFFITHS, E. – 1992. Bacterial transferrin receptors-structure, function and contribution to virulence. Med. Microbiol. Immunol. 181: 301-322.
- WOOLEY, R.E. & BLUE, J.L. – 1976. Bacterial isolations from canine and feline urine. Mod. Vet. Pract. 57: 535-538.
- WOOLEY, R.E.; SPEARS, K.R.; BROWN, J.; NOLAN, L.K. & FLETCHER, O.J. – 1992. Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 36: 679-684.
- WOOLEY, R.E.; NOLAN, L.K.; BROWN, J.; GIBBS, P.S.; GIDDINGS, C.W. & TURNER, K.S. – 1993. Association of K1 capsule, smooth lipopolysaccharides, *trtT* gene, and Colicin V production with complement resistance and virulence of avian *Escherichia coli*. Avian Dis. 37: 1092-1096.
- WOOLEY, R.E.; GIBBS, R.S.; BROWN, T.P.; GLISSON, J.R.; STEFFENS, W.L. & MAURER, J.J. – 1998. Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11. Avian Dis. 42:194-198.

YE, C. & XU, J. – 2001. Prevalence of iron transport gene on pathogenicity associated island of uropathogenic *Escherichia coli* in *E. coli* O157:H7 containing Shiga toxin gene. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2300-2305.

YEH, F.C.; YANG, R.C. & BOYLE, Y. – 1999. Popgene version 1.31. Microsoft Windows-based freeware for Population Genetic Analysis (website: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>).

Typing of avian pathogenic *Escherichia coli* strains by REP-PCR¹

Marcelo Brocchi^{2,4}, Alessandra Ferreira², Marcelo Lancellotti², Eliana Guedes Stehling², Tatiana Amabile de Campos², Gerson Nakazato², Antonio Fernando Pestana de Castro³ and Wanderley Dias da Silveira^{2*}

ABSTRACT - Brocchi M., Ferreira A., Lancellotti M., Stehling E.G., Campos T.A., Nakazato G., Pestana de Castro A.F. & Silveira W.D. 2006. **Typing of avian pathogenic *Escherichia coli* strains by REP-PCR.** Pesquisa Veterinária Brasileira 26(2):00-00. Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Cx. Postal 6109, Campinas, SP CEP: 13081-862, Brasil.
E-mail: wds@unicamp.br

In the present study the repetitive extragenic palindromic (REP) polymerase chain reaction (PCR) technique was used to establish the clonal variability of 49 avian *Escherichia coli* (APEC) strains isolated from different outbreak cases of septicemia (n=24), swollen head syndrome (n=14) and omphalitis (n=11). Thirty commensal strains isolated from poultry with no signs of these illnesses were used as control strains. The purified DNA of these strains produced electrophoretic profiles ranging from 0 to 15 bands with molecular sizes varying from 100 bp to 6.1 kb, allowing the grouping of the 79 strains into a dendrogram containing 49 REP-types. Although REP-PCR showed good discriminating power it was not able to group the strains either into specific pathogenic classes or to differentiate between pathogenic and non-pathogenic strains. On the contrary, we recently demonstrated that other techniques such as ERIC-PCR and isoenzyme profiles are appropriate to discriminate between commensal and APEC strains and also to group these strains into specific pathogenic classes. In conclusion, REP-PCR seems to be a technique neither efficient nor universal for APEC strains discrimination. However, the population clonal structure obtained with the use of REP-PCR must not be ignored particularly if one takes into account that the APEC pathogenic mechanisms are not completely understood yet.

INDEX TERMS: Avian *Escherichia coli*, typing, REP-PCR.

¹ Received on July 14, 2005.

Accepted for publication on September 12, 2005.

² Depto Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Cx.Postal 6109, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n, Barão Geraldo, Campinas, SP CEP: 13081-862, Brazil. *Author for correspondence. E-mail: wds@unicamp.br

³ Depto Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas II, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, 2º Andar, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP CEP 05508-900, Brazil.

⁴ Depto Biologia Celular, Molecular e Bio-Agentes Patogênicos, Av. dos Bandeirantes, 3900, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. CEP 14049-900, Brazil.

RESUMO - [Tipificação de amostras aviárias patogênicas de *Escherichia coli* pela REP-PCR.] A técnica de REP (*Repetitive extragenic palindrome*)-PCR foi utilizada para avaliar a variabilidade genética de 49 amostras de *Escherichia coli* patogênicas para aves (APEC), isoladas de aves de corte (frangos) em diferentes surtos de septicemia (n=24), síndrome da cabeça inchada (n=14) e onfalite (n=11). Trinta amostras comensais, isoladas de frangos sem sinais de doença, foram utilizadas como controle. A análise do perfil eletroforético obtido por reação de REP-PCR utilizando DNA purificado das amostras evidenciou a amplificação de 0 a 15 bandas de DNA com pesos moleculares variando entre 100 pb e 6.1 Kb. A análise deste padrão permitiu a construção de um dendrograma demonstrando o agrupamento das 79 amostras em 49 perfis distintos. Embora a técnica de REP-PCR tenha apresentado grande poder discriminatório, as amostras patogênicas e não patogênicas não foram discriminadas entre si assim como não foi observado o agrupamento de amostras causadoras do mesmo tipo de doença. Por outro lado, demonstramos recentemente que outras técnicas tais como ERIC-PCR e a análise de isoenzimas foram eficientes quando utilizadas para esta mesma finalidade. Concluindo, REP-PCR parece não ser uma técnica eficiente e universal para discriminar entre amostras APEC. Porém, a estrutura clonal populacional obtida com o uso de REP-PCR não deve ser desprezada, particularmente se considerarmos que os mecanismos de patogenicidade de APEC ainda não são completamente conhecidos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Escherichia coli* aviária, tipificação, REP-PCR.

INTRODUCTION

In poultry, the gram-negative bacterium *Escherichia coli* is an important cause of diseases resulting in serious economic losses to the poultry industry (Gross 1994). These strains are designated avian pathogenic *E. coli* (APEC) (Dho-Moulin & Fairbrother 1999) and the diseases they cause are mainly septicemia, swollen head syndrome, omphalitis, cellulitis, yolk-sac infection and respiratory tract infections (Sojka & Carnaghan 1961, Morley & Thomson 1984, Randall et al. 1984). It has been proposed that some of the above mentioned diseases such as septicemia and swollen head syndrome start as secondary infections triggered by an initial *Mycoplasma* or viral infection followed by an invasive phase (Gross 1961, Aycard & Lafont

1969, Dho & Lafont 1982, Morley & Thomson 1984). Omphalitis appears to be initiated by the bacterium actively crossing the egg barriers during the laying process or during incubation (Gross 1994) and in this case such types of bacteria would act just as opportunistic agents (Silveira et al. 2002a).

Several studies have been conducted in an attempt to understand the pathogenic mechanisms and virulence factors expressed by these strains (reviewed in Dho-Moulin & Fairbrother 1999 and La Ragione & Woodward 2002). Although many pathogenic factors of APEC strains were described (Fantinatti et al. 1994, Silveira et al. 1994, Gomis et al. 1997, Pourbakhsh et al. 1997a,b, Janßen et al. 2001, Silveira et al. 2002a) many not yet described genes or virulence factors could probably be involved.

The discovery that prokaryotic genomes contain repeated sequences such as the repetitive extragenic palindrome (REP), or palindromic unit (PU) sequence (Higgins et al. 1982, Gilson et al. 1984), and the enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence (Hulton et al. 1991) has expanded the molecular biology tools that are available to assess the clonal variability of many bacterial strains including *Escherichia coli* (Versalovic et al. 1991, Dalla-Costa et al. 1998). These molecular techniques are based on the use of primers homologous to these sequences that after PCR reaction generate a pattern of amplified bands specific for each isolate (Versalovic et al. 1991). Other molecular techniques such as Ribotyping and Isoenzyme profile have also been used to evaluate the clonality of avian *E. coli* (Silveira et al. 2003).

We recently demonstrated that ERIC-PCR and Isoenzyme analysis are suitable for discrimination between commensal and APEC strains and also to group these strains into specific pathogenic classes (Silveira et al. 2002b, 2003).

The purpose of the present study was to evaluate if REP-PCR, a typing method using REP sequences as targets for PCR amplification, are also useful for studies of the clonal structure of APEC. The same APEC and commensal strains previously analyzed by ERIC-PCR and Isoenzyme profiles were here evaluated. All the strains were isolated in Brazil and are responsible for different diseases (septicemia, swollen head syndrome and omphalitis) of chickens. The commensal *E. coli* strains were isolated from the gastrointestinal tract of adult birds showing no clinical signs of these diseases and were used as control. Most of these strains were previously investigated for the presence of pathogenic traits and for pathogenicity in the one day-old-chicks assay (Silveira et al. 2002b).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Twenty-four septicemic (S), 14 swollen head syndrome (H) and 11 omphalitis (O) *Escherichia coli* strains isolated from different outbreaks, and 30 commensal strains (N) isolated from foals showing no signs of any of the above diseases and belonging to the Laboratory of Microbial Molecular Biology, DMI, UNICAMP, were studied in the present investigation. With the exception of commensal strains that were isolated from two different ranches located at least 50 Km apart, all the other strains were obtained from different outbreaks occurred in different regions of Brazil (Table 1). For each case, three colonies were isolated and from those, which had the same plasmid and antimicrobial drugs resistance profiles, just one strain was used to make a frozen stock. Strains were identified as *Escherichia coli* by biochemical tests. Strains from septicemic cases were isolated from liver, air sacs and lung; swollen head syndrome strains were isolated from infraorbital sinuses and omphalitis strains were isolated from the yolk sacs of one-day-old chicks; commensal strains were collected from cloacae region. All strains were kept at -70°C in LB medium containing 15% glycerol to avoid recombination events and plasmid losses.

Extraction of genomic DNA. Genomic bacterial DNA was extracted as described by Van Soolingen et al. (1991). Extracted DNA was resuspended in TE buffer plus 10 mg/ml of RNase and its integrity after extraction was determined using 0.7% agarose gels in TE buffer as described by Sambrook et al. (1989).

REP-PCR conditions and primers. REP-PCR primer sequences: REP1R-I, 5'-IIIICGICATCIGGC-3' and REP2-I. 5'-ICGICTTATCIGGCCTA-3' and the PCR reaction conditions were as described by Versalovic et al. (1991), in a final volume of 50µl, with slight modifications as follows: an initial denaturation (94°C, 7min) followed by 30 cycles of denaturation (90°C, 30sec), annealing (40°C, 1min), and extension (72°C, 8 min) with a single final extension (72°C, 15min). The size of the amplified fragments was visualized by electrophoresis in submerged agarose gel (1.5%) using 100 bp and 1 kb DNA markers (Life Technologies) as standards. The PCR for each strain was performed in three separate experiments to confirm the pattern of amplified bands.

Agarose gel electrophoresis. Agarose (1.5%) gel electrophoresis was performed as described by Sambrook et al. (1989).

Fingerprint analyses. REP fingerprints of amplified DNA fragments obtained by agarose gel electrophoresis were recorded. The presence of a given band was coded as 1 and the absence of a given band was coded as 0 in a data matrix and analyzed using the Popgene software (Version 1.31) (Yeh et al. 1999). Dendrograms of dissimilarity were constructed for each case.

RESULTS

A total of 79 *Escherichia coli* strains isolated from birds were studied. Of these, 49 were obtained from birds showing clinical signs of septicemia (n=24), swollen head syndrome (n=14), or omphalitis (n=11) and 30 strains, termed commensal, were isolated from the cloacae of poultry showing no signs of any kind of the above diseases. All strains were studied in terms of the electrophoretic profiles of their DNA fragments obtained after PCR amplification using specific primers for REP elements. The DNA amplification of the *E. coli* strain was reproducible in the three amplifications experiments performed and the fingerprinting generated distinct amplification bands ranging in size from 100 bp to 6.1 kb (data not shown). The obtained profiles allowed the grouping of the 79 strains into 49 REP-types (Fig.1) ranging from 0 to 15 bands, resulting in a dendrogram of high polymorphism but with a degree of dissimilarity not exceeding 15%.

Among all the clusters obtained, one (cluster I, Fig.1) comprised 72.15% of all studied strains including 79.2%, 90.9%, 50% and 70% of septicemic, omphalitis, swollen head syndrome and commensal strains, respectively.

It was possible to observe that although many strains responsible for causing the same type of disease had total genomic identity by this technique, strains isolated from birds suffering from different types of diseases also had total or even a very close genomic identity.

DISCUSSION

The initial works describing the clonal structure of *E. coli* populations were those published by Selander & Levin (1980) and Achtman et al. (1983). The most commonly used biochemical method to characterize bacterial populations is multilocus enzyme electrophoresis (Selander et al. 1986) and among the molecular genetic fingerprinting techniques, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), restriction fragment length polymorphism (RFLP) and Multi-locus sequence typing (MLST) are considered to be the most accurate and reproducible ones (Olive & Bean 1999, Chansiripornchai et al. 2001, Urwin & Maiden 2003). PFGE, RFLP and MLST analysis require relatively large amounts of DNA are time consuming and require expensive equipment, thus being unsuitable for most laboratories that work with bacterial populations.

Other molecular techniques such as random amplification of polymorphic DNA (RAPD), repetitive extragenic palindromic sequences (REP) and enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) (Welsh & McClelland 1990, Versalovic et al. 1991, Silveira et al. 2002b) use less expensive equipment and can analyze the data within one day of work.

The 79 avian *Escherichia coli* strains analyzed in the present study (Fig.1) were found to have a high degree of polymorphism upon REP analysis, in agreement with the results obtained by another Brazilian group (De Moura et al. 2001) and by other groups either with RAPD (Chansiripornchai et al. 2001) or with multilocus enzyme electrophoresis (Achtman et al. 1983, Selander et al. 1986, Silveira et al. 2003) and ERIC-PCR (Silveira et al. 2002b). However, our results are different from those obtained by De Moura et al. (2001) that found similar discrimination power between REP and ERIC-PCR.

When we look at the distribution of the strains inside the constructed dendrogram we can see that, although REP-PCR has discriminating capacity, there is no real separation according to the type of disease from which the strain was isolated. The REP-PCR also did not discriminate between commensal and pathogenic strains. These results are different of those recently described by us using ERIC and Isoenzyme profile (Silveira et al. 2002b, 2003). Using these techniques we were able to discriminate between these *E. coli*, separating pathogenic and non-pathogenic strains into different clusters and grouping most of the strains according to the disease origin. Thus, our results indicated that REP-PCR *per se* is less

affective than ERIC and Isoenzyme profiles to group APEC strains according to the pathogenic process.

Our results also agree with others studies that compared REP-PCR with others typing methods. Dombek et al. (2000), for example, demonstrated that REP-PCR was less effective than Box-derived fingerprints to discriminate among *E. coli* isolated from humans and others animals, including chickens. In another study, Lipman et al. (1995), comparing the ability of fingerprints performed with REP and ERIC primers, concluded that the last was more effective in differentiating among *E. coli* strains from cows with clinical mastitis.

Based on the present results, we suggest that REP-PCR can discriminate between APEC strains. However, when employed for the genomic characterization of APEC populations, this technique is not effective for these strains types.

The discrepancies between our data and those obtained by de Moura et al. (2001) regarding the use of REP-PCR for APEC discrimination could be explained by genetic variability between different bacterial populations. In fact, the strains here analyzed and those studied by de Moura et al. (2001) are not related epidemiologically. In conclusion, in the light of these contradictory results, we believe that REP-PCR is not a universal and reliable technique to discriminate between APEC strains. Our data suggest that other techniques as such as ERIC-PCR and isoenzyme profiles should be used in place of REP-PCR for APEC discrimination.

There is still much to be explored for a better comprehension of the APEC pathogenesis. Thus, the genetic relationship between these strains obtained with REP-PCR must not be ignored. Maybe, in the near future, when the mechanisms of pathogenicity and the virulence factors of avian pathogenic *E. coli* strains come to be better understood, the meaning of the APEC population structure achieved with this technique could be better understood.

Acknowledgments.- This work was supported by grants (n° 03/08407-0 and n° 99/04097-0) from The Foundation for the Support of Research of the State of São Paulo (FAPESP) and (n° 303301/2002-3) from The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

REFERENCES

- Achtman M., Mercer A., Kusecek B., Pohl A., Heuzenroeder M., Aaronson W., Sutton A. & Silver R.P. 1983. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect. Immun.* 39:315-335.
- Aycard J. & Lafont J.P. 1969. Données récentes sur l'étiologie et l'épizootologie de la mycoplasmosse du poulet. Conséquences prophylactiques. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 72:351-380.
- Chansiripornchai N., Ramasoota P., Sasipreyajan J. & Severson S.B. 2001. Differentiation of avian *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet. Microbiol.* 80:75-83.
- Dalla-Costa L.M., Irino K., Rodrigues J., Rivera I.N.G. & Trabulsi LR. 1998. Characterization of diarrhoeagenic *Escherichia coli* clones by ribotyping and ERIC-PCR. *J. Med. Microbiol.* 47:227-234.
- De Moura A.C., Irino K. & Vidotto M.C. 2001. Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. *Avian. Dis.* 45:173-181.
- Dho M. & Lafont J.P. 1982. *Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: Comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxigenic chickens. *Avian. Dis.* 26:787-797.
- Dho-Moulin M. & Fairbrother J.M. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30:299-316.
- Dombek P.E., Johnson L.K., Zimmerley S.T. & Sadowsky M.J. 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2572-2577.
- Fantinatti F., Silveira W.D. & Pestana de Castro A.F. 1994. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 41:75-86.
- Gilson E., Clément J.M., Brutlag D. & Hofnung M. 1984. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 3:1417-1421.
- Gomis S.M., Watts T., Riddell C., Potter A.A. & Allan B.J. 1997. Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. *Avian. Dis.* 41:234-240.
- Gross W.B. 1961. The development of "air sac disease". *Avian. Dis.* 5:431-439.
- Gross W.B. 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry, p.237-259. In: Gyles CL (ed.) *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallingford, UK.

- Higgins C.F., Ames G.F.L., Barnes W.N., Clément J.M. & Hofnung M 1982. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature* 298:760-762.
- Hulton C.S., Higgins C.F. & Sharp P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5:825-834.
- Janßen T., Schwerz C., Preikschat P., Voss M.H., Philipp C. & Wieler L.H. 2001. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:371-378.
- La Ragione, R.M. & Woodward, M.J. 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet.Sci.* 73:27-35.
- Lipman L.J., de Nijs A., Lam T.J. & Gaastra, W. 1995. Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. *Vet. Microbiol.* 43:13-19.
- Morley A. J. & Thomson D.K. 1984. Swollen head syndrome in broiler chickens. *Avian. Dis.* 28: 238-243.
- Olive D.M. & Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 3:1661-1669.
- Pourbakhsh S.A., Boulianne M., Martineau-Doizé B., Dozois C.M., Desautels C. & Fairbrother J.M. 1997a. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian. Dis.* 41: 221-233.
- Pourbakhsh S.A., Dho-Moulin M., Brée A., Desautels C., Martineau-Doize B. & Fairbrother J.M. 1997b. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Pathog.* 22:331-41.
- Randall C.J., Meakins P.A., Harris M.P. & Watt D.J. 1984. A new skin disease in broilers? *Vet. Rec.* 114:246.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 1584 p.
- Selander R.K. & Levin B.R. 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* 210:545-547.

- Selander R.K., Gaugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N. & Whittam T.S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 873-884.
- Silveira W.D., Fantinatti F. & Pestana de Castro A.P. 1994. Transposon mutagenesis and membrane protein studies in avian colisepticaemic *Escherichia coli* strain. *Braz. J. Genet.* 17: 9-14.
- Silveira W.D., Ferreira A., Brocchi M., Hollanda L.M., Pestana de Castro A.F., Yamada A.T. & Lancellotti M. 2002a. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 85: 47-53.
- Silveira W.D., Ferreira A., Lancellotti M., Barbosa I., Leite D.S., Pestana de Castro A.F. & Brocchi M. 2002b. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. *Vet. Microbiol.* 89:323-328.
- Silveira W.D., Lancellotti M., Ferreira A., Solferini V.N., Pestana de Castro A.F., Stehling E.G. & Brocchi M. 2003. Determination of the Clonal Structure of Avian *Escherichia coli* Strains by Isoenzyme and Ribotyping Analysis. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Hlth* 50:63-69.
- Sojka W.J. & Carnaghan R.B.A. 1961. *Escherichia coli* infection in poultry. *Res. Vet. Sci.* 2:340-352.
- Urwin R. & Maiden M.C. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends. Microbiol.* 11:479-487.
- Van Soolingen D., Hermans P.W.M., Hass P.E.W., Sool D.R. & Van Embden J.D.A. 1991. The occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains; evaluation of IS-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2578-2586.
- Versalovic J., Koeuth T. & Lupski J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic. Acid. Res.* 19:6823-6831.
- Welsh J. & McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic. Acids. Res.* 18:7213-7218.
- Yeh F.C., Yang R.C. & Boyle T. 1999. Popgene version 1.31. Microsoft Windows-based freeware for Population Genetic Analysis. (website: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>).

Table 1. *E. coli* strains used in the present study

Pathogenic process	Strain (n)	Origin
Omphalitis (O)	11	São Paulo State
Septicemia (S)	12	Paraná State
Septicemia (S)	12	Minas Gerais State
Swollen Head Syndrome (H)	15	São Paulo State
Commensal (N)	15	São Paulo State, Ranch 1
	15	São Paulo State, Ranch 2

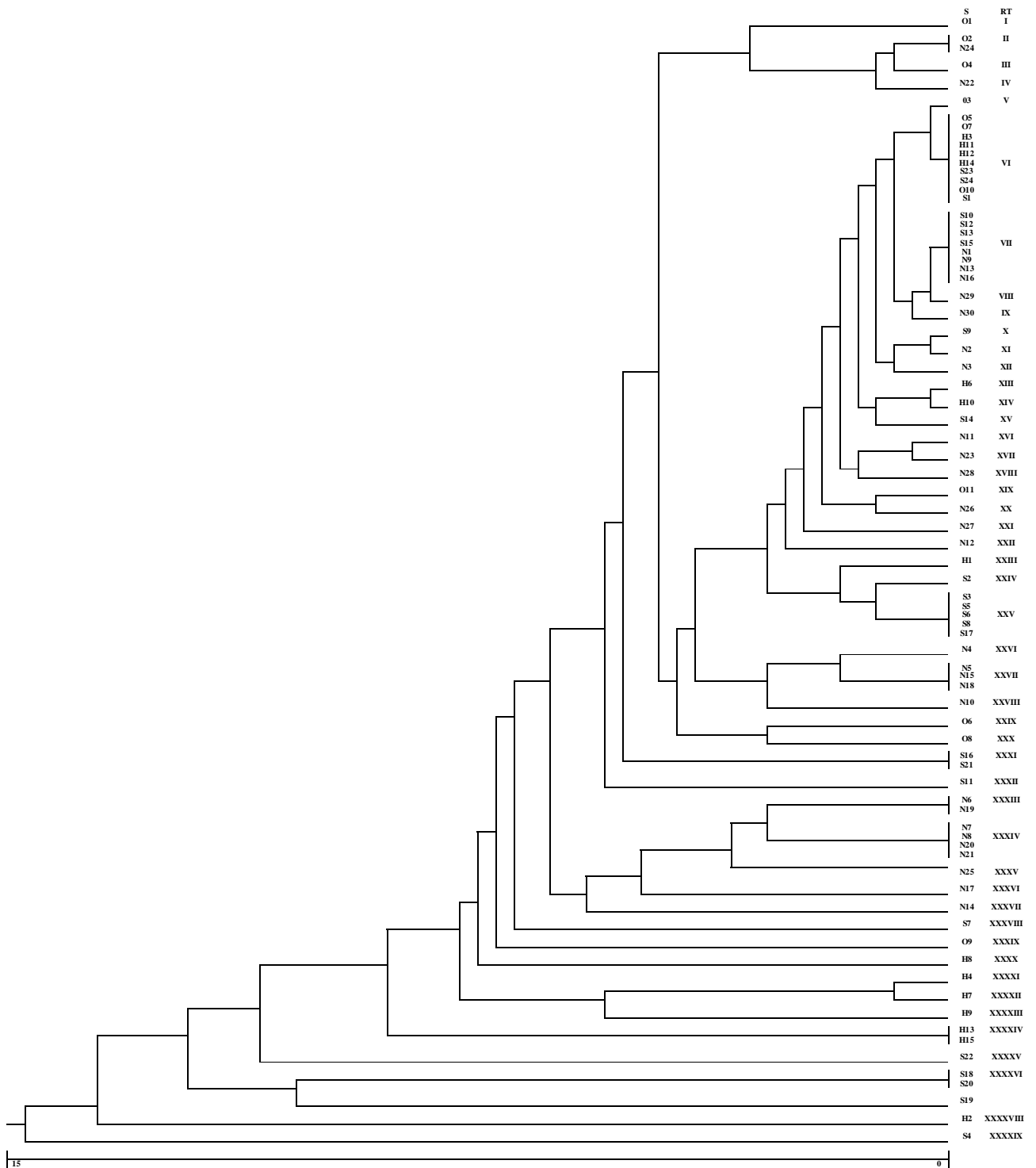


Fig.1. Dendrogram of dissimilarity showing the genetic distance of APEC and commensal *Escherichia coli* strains based on REP-PCR analyses (* Cluster I).