



**Universidade de Évora**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**Instituto Nacional de Investigação Agrária e  
Veterinária**

**Estudo de genes de virulência de  
estirpes de *Avian Pathogenic  
Escherichia coli* de aves de produção,  
para preparação de uma autovacina  
para imunização protetora**

**Ana Raquel Carrilho Paixão**

Orientação: Professor Doutor Luís Martins  
(Universidade de Évora)

Coorientação: Doutora Maria Inácia Corrêa de Sá  
(Instituto Nacional de Investigação Agrária e  
Veterinária)

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação de Mestrado

Évora, 2015

**Universidade de Évora**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária**

**Estudo de genes de virulência de estirpes  
de *Avian Pathogenic Escherichia coli* de  
aves de produção, para preparação de  
uma autovacina para imunização  
protetora**

**Ana Raquel Carrilho Paixão**

Orientação: Professor Doutor Luís Martins  
(Universidade de Évora)

Coorientação: Doutora Maria Inácia Corrêa de Sá  
(Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária)

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação de Mestrado

Évora, 2015



# Agradecimentos

Aproveito esta secção para agradecer a todas as pessoas que ao longo do Mestrado em Bioquímica me ajudaram, de forma direta ou indireta, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo aqui, algumas palavras com um profundo sentimento de reconhecimento e gratidão.

Ao *Coordenador do Mestrado, Professor Doutor Rui Alves-Ferreira*, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar o Mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

Ao *Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária*, e ao seu Diretor, *Professor Doutor Miguel Fevereiro*, por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha tese e por permitir a minha integração num centro de investigação de tão elevada qualidade e exigência.

Ao *Professor Doutor Luís Martins*, expresso o meu agradecimento pela orientação, apoio e pela oportunidade de integrar um projeto de investigação que acredito poder abrir-me várias portas no meu futuro profissional.

À *Doutora Maria Inácia Vacas de Carvalho Corrêa de Sá* expresso o meu mais profundo agradecimento pela coorientação e apoio incondicionais que em muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer saber mais e a minha vontade constante de querer fazer melhor. Agradeço também a correção desta dissertação e a oportunidade de integrar o seu grupo de investigação. Reconheço, com gratidão, a confiança que depositou em mim.

À *Engenheira Ana Cristina Ferreira Inácio*, o meu sincero agradecimento pela ajuda na elaboração no protocolo experimental. Muito obrigada pelo profissionalismo, amizade e total disponibilidade que sempre demonstrou para comigo.

À *Dra. Ivone Correia*, à *Dra. Lurdes Clemente* e à *Dra. Patrícia Themudo*, da Unidade de Bacteriologia, agradeço a colaboração na cedência das estirpes que possibilitaram a realização deste Projeto.

Às Técnicas do Sector de Brucelose, *Cristina Ferreira e Alice Gerardes*, o meu muito obrigado pela amizade, companheirismo e pelos bons momentos passados, fatores importantes que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação.

À *Minha família*, aos *Meus Pais*, um enorme obrigado pelos ensinamentos e conselhos para a vida. Espero que com esta etapa terminada consiga retribuir e compensar, de alguma forma, todo o carinho, apoio e dedicação constantes que sempre me ofereceram.

## Resumo

A Colibacilose é um grave e importante problema económico em explorações aviárias. As estirpes de *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) causam uma larga variedade de infeções extraintestinais em aviários, nomeadamente: aerosaculite, colisepticémia e celulites nos frangos de carne e salpingites e peritonites nas galinhas reprodutoras.

Neste trabalho foram estudadas 127 estirpes de *Escherichia coli* isoladas de galinhas reprodutoras mortas com colibacilose (66) e de frangos de carne saudáveis (61). As sessenta e seis estirpes foram tipificadas com os soros O2, O18 e O78, os serogrupos mais associados com a doença. O78 foi o mais comum (58%). Todas as amostras foram analisadas para a presença/ausência de 11 genes de virulência: *astA*, *chuA*, *cvaA/B*, *fimC*, *fyuA*, *irp2*, *iss*, *iucD*, *papC*, *tsh* e *vat* por PCR-Multiplex.. O gene *fimC* foi detetado em 93% dos isolados. Todas as estirpes patogénicas possuíam genes relacionados com a absorção de ferro. Os resultados mostram que alguns dos genes são comuns às estirpes comensais e patogénicas.

**Palavras-chave:** *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC), *Avian Faecal Escherichia coli* (AFEC), *astA*, *chuA*, *cvaA/B*, *fimC*, *fyuA*, *irp2*, *iss*, *iucD*, *papC*, *tsh* e *vat*.

## *Abstract*

**Title: Study of virulence genes from *avian pathogenic Escherichia coli* isolated from poultry farms to prepare an auto vaccine to immunization and protection**

The Colibacillosis is a serious disease and an important economic problem in poultry farms. It is mainly caused by *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) strains that cause a variety of extraintestinal diseases in poultry farms. The most commonly associated pathologies are: airsacculitis, colisepticemia and cellulitis in broiler chickens, and, salpingitis and peritonitis in laying hens.

In this work a total of 127 strains of *Escherichia coli* isolated from dead laying hens with colibacillosis (66) and healthy broilers (61) were studied. The strains from laying hens were typified with O2, O18 and O78 serogroups that are mainly associated with disease. O78 was the most common serogroup (58%). All strains were analysed for the presence of 11 virulence genes: *astA*, *chuA*, *cvaA/B*, *fimC*, *fyuA*, *irp2*, *iss*, *iucD*, *papC*, *tsh* and *vat* by Multiplex-PCR. The gene *fimC* was detected in 93% of the isolates. All pathogenic strains harboured iron uptake-related genes. The results show that some genes are common to both commensal and pathogenic *E. coli* strains.

**Keywords:** *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC), *Avian Faecal Escherichia coli* (AFEC), *astA*, *chuA*, *cvaA/B*, *fimC*, *fyuA*, *irp2*, *iss*, *iucD*, *papC*, *tsh* and *vat*.

# Índice Geral

<b>Índice de Figuras</b> .....	IX
<b>Índice de Tabelas</b> .....	X
<b>Lista de abreviaturas utilizadas ao longo do texto</b> .....	XI
<b>Unidades de medida utilizadas</b> .....	XIII
1. Introdução.....	1
1.1. Fatores de Virulência .....	3
1.1.1. Adesinas .....	4
<i>Fimbriae Mannose-binding type 1 (Fim 1) - fimC</i> .....	5
<i>P Fimbriae - papC</i> .....	6
<i>Temperature-sensitive haemagglutinin (Tsh) - tsh</i> .....	7
1.1.2. Sistemas de Aquisição e Transporte de Ferro .....	8
<i>E. coli hemeutilization protein A (ChuA) - chuA</i> .....	9
<i>Iron-uptake systems of E.coli (Iuc) - iucD</i> .....	10
<i>Ferric yersiniabactin uptake (FyuA) - fyuA</i> .....	11
<i>Iron-repressible proteins 2 - irp2</i> .....	12
1.1.3. Sobrevivência Sérica.....	13
<i>Increased serum survival (Iss) - iss</i> .....	13
1.1.4. Toxinas .....	14
<i>Vacuolating Autotransporter Toxin (VAT) - vat</i> .....	14
<i>EAggEC heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) - astA</i> .....	15
<i>Colicin V (CoIV) – cvaA/B</i> .....	15
2. Hipótese e Objetivos .....	16
3. Procedimento experimental.....	17
3.1. Estirpes Bacterianas e condições de crescimento .....	17
3.2. Serotipificação .....	17
3.3. Preparação de DNA .....	17
3.4. PCR-multiplex .....	18
3.5. Separação dos fragmentos resultantes da amplificação .....	20
3.6. Análise estatística .....	20
3.7. Análise de agrupamento.....	21
4. Resultados .....	22



4.1.	Serotipificação .....	22
4.2.	Perfil dos genes de virulência.....	22
4.3.	Perfil dos genes de virulência/serogrupo .....	24
4.4.	Perfil genético das estirpes segundo Ewers.....	25
4.5.	Comparação do perfil genético das APEC com as AFEC e com as estirpes virulentas e não virulentas de acordo com Ewers.....	27
4.6.	Análise de agrupamento entre estirpes APEC e AFEC .....	28
5.	Discussão.....	30
6.	Conclusões e perspectivas futuras .....	34
7.	Referências bibliográficas .....	36
Anexos	.....	I
Anexo A	.....	II
Anexo B	.....	III
Anexo C	.....	V
Anexo D	.....	IX
Anexo E	.....	XI

# Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Distribuição dos diferentes patotipos de <i>Escherichia coli</i> (adaptado de Cunha, 2014).....	2
<b>Figura 2:</b> Representação da interação das <i>E. coli</i> com a célula hospedeira. ME: membrana externa, MI: membrana interna (Johnson, 1991). .....	5
<b>Figura 3:</b> Esquema ilustrativo da transcrição e formação das Fim 1 (Adaptado de Ritter, 1997). Verifica-se que as recombinases FimB e FimE controlam a expressão de FimA que só ocorre se houver <i>switch</i> genético e se estiver na posição <i>on</i> . A recombinase FimE promove o <i>switch</i> de <i>on</i> para <i>off</i> e a recombinase FimB na direção inversa (Ritter 1997; Snyder 2005). Desta forma as bactérias alternam entre a fase <i>on</i> (expressão-A) e a fase <i>off</i> (não expressão-B) E a FimC promove a translocação através do periplasma (Pusz, 2014).....	6
<b>Figura 4:</b> Organização do <i>operon</i> da <i>P Fimbriae</i> (adaptado de Cunha, 2014). .....	7
<b>Figura 5:</b> Sistemas de captura de ferro em <i>E. coli</i> (Porcheron, 2013). .....	10
<b>Figura 6:</b> Organização dos genes <i>iucABCD</i> necessários à síntese da aerobactina. A atividade enzimática sequencial de IucD, IucC e IucA converte a L-lisina na aerobactina, um importante captador de ferro (adaptado de Troxell, 2013). .....	11
<b>Figura 7:</b> Diferentes etapas na aquisição das PAI. (1) Um elemento genético é adquirido através de transferência horizontal (bacteriófago) (2) seguido da aquisição com sucesso; (3) recombinação mediada por recombinases; (4) integração do elemento no cromossoma; (5) perda de genes que possibilitam a integração das PAI no cromossoma. Esta aquisição confere alguma vantagem seletiva; (6) que é transmitida às novas gerações; (7) e disseminada no meio ambiente para outros microrganismos (adaptado de Gal-Mor, 2006).....	12
<b>Figura 8:</b> O Dendrograma mostra a relação entre as APEC e AFEC com base na análise UPGMA.....	29
<b>Gráfico 1:</b> Comparação da prevalência de VAGs nas estirpes APEC e AFEC. ....	22
<b>Gráfico 2:</b> Distribuição por função dos genes estudados nas duas populações e no total das estirpes. ....	24
<b>Gráfico 3:</b> Distribuição em percentagem das estirpes virulentas em APEC e em AFEC de acordo com a classificação de Ewers.....	26
<b>Gráfico 4:</b> Distribuição por funções dos genes estudados nas estirpes virulentas de acordo com a definição de Ewers. ....	27

<b>Gráfico 5:</b> Comparação da distribuição das funções dos genes nas APEC e AFEC e nas estirpes virulentas e não virulentas. ....	28
---	----

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Sequências e especificidades dos <i>primers</i> utilizados nas PCR-Multiplex 1 e 2 e tamanho dos seus produtos. ....	19
<b>Tabela 2:</b> Prevalência dos VAG nas estirpes isoladas. ....	23
<b>Tabela 3:</b> Prevalência dos VAGs nos serogrupos O78, O2 e O18. ....	25
<b>Tabela 4:</b> Prevalência dos VAGs nas estirpes virulentas segundo Ewers.....	26
<b>Tabela 5:</b> Mistura de reação utilizada quer na PCR 1 quer na PCR2. ....	VII
<b>Tabela 6:</b> Ciclos utilizados na PCR 1 e PCR 2.....	VIII

# Lista de abreviaturas utilizadas ao longo do texto

<b>A</b>	<b>E</b>	<b>HMWP2-high-molecular-weight protein 2</b>
<b>ABC-ATP-binding casset</b> <i>ABC</i>	<b>EAEC-E.coli</b> enteroagrativas	<b>I</b>
<b>AFEC-Avian Faecal</b> <i>Escherichia coli</i>	<b>EAST1-EAggEC heat-stable enterotoxin 1</b>	<b>IBDV - Infectious Bursal Disease Virus</b>
<b>APEC - Avian Pathogenic</b> <i>Escherichia coli</i>	<b>E. coli - Escherichia coli</b>	<b>IBV- Infectious Bronchitis Virus</b>
<b>astA-Arginine succinyltransferase A</b>	<b>EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid</b>	<b>inPEC-E.coli</b> extraintestinal
<b>ATP-adenosine triphosphate</b>	<b>EHEC-E.coli.</b> enterohemorrágica	<b>inVAGs-intestinals</b> virulence-associated genes
<b>C</b>	<b>EIEC-E.coli</b> enteroinvasiva.	<b>irp2-iron-repressible high-molecular-weight proteins 2</b>
<b>ChuA-E.coli</b> hemeutilization protein A	<b>EPEC-E.coli</b> enteropatogénica	<b>iss-increased serum survival</b>
<b>ChuT-E.coli</b> hemeutilization transporter protein	<b>ETEC-E.coli</b> enterotoxigenica	<b>iucABCD-iron-uptake systems of E.coli</b>
<b>ColV-Colicin V</b>	<b>ExPEC-E. coli Patogénica</b> extra-intestinais	<b>L</b>
<b>D</b>	<b>exVAGs - extraintestinais</b> virulence-associated genes	<b>LP - lipopolisacárido</b>
<b>dATP-deoxyadenosine triphosphate</b>	<b>F</b>	<b>M</b>
<b>dCTP-Deoxycytidine triphosphate</b>	<b>F-Forward</b>	<b>MAC-membrane attack complex</b>
<b>dGTP-deoxyguanosine triphosphato</b>	<b>Fim 1- fimbriae Mannose-binding type 1</b>	<b>MDV - Marek's disease virus</b>
<b>DNA - Deoxyribonucleic acid</b>	<b>fyuA-ferric yersiniabactin uptake</b>	<b>ME - membrana externa</b>
<b>dNTPs-deoxinucleosídeos trifosfato</b>	<b>G</b>	<b>MFP-membrane fusion protein</b>
<b>dTTP-deoxythimidine triphosphato</b>	<b>GMPc-guanosine monophosphate cyclic</b>	<b>MI - membrana interna</b>
	<b>H</b>	<b>N</b>
	<b>Hma-heme acquisition protein</b>	<b>NDV - Newcastle disease vírus</b>

**NMEC** –*E. coli* neonatal meningite

**NRPS** - *non-ribosomal peptide synthesis*

## O

**OIs** ou **Primers-**  
Oligonucleotidos iniciadores

**OMP**-*outer membrane protein*

**OMS**-Organização Mundial de Saúde

**ORFs**-*open reading frame*

## P

**p.b.** - pares de bases

**PAI**- Ilha Associada à Patogenicidade

**pap**-*pielonefrite associated pili*

**PCR**-*Polymerase Chain Reaction*

## R

**ROS**-*Reactive Oxygen Species*

**R**-*Reverse*

## S

**SAT**-*Secreted Autotransportes Toxin*

## T

**TBE**-Tampão tris- borato EDTA

**Tsh** - *Temperature sensitive haemagglutinin*

**Tsh $\beta$**  - *Temperature-sensitive haemagglutinin  $\beta$*

## U

**UPEC**-*E. coli* uropatogénica

**UPGMA**-*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*

**UV**-ultravioleta

## V

**VAGs**-*virulence-associated genes*

**VAT**-*Vacuolating Autotransporter Toxin*

## Unidades de medida utilizadas

**pmol/μL**- picomol por microlitro

**ng/μL** – nanograma por microlitro

**mg/mL** – miligrama por mililitro

**U/μL** – unidade por microlitro

**pM**- picomolar

**mM**- milimolar

**pmol** – picomol

**ng** – nanograma

**mg** – miligrama

**g** – grama

**μL** – microlitro

**mL**- mililitro

**% m/v** – percentagem em massa por volume

**min** – minuto

**s** - segundo

**h** – hora

**°C** – grau Celsius

**V** – volt

**g** – força centrífuga

**rpm** – rotações por minuto

**%** - percentagem

**kDa** – kiloDalton

**nm** - nanómetro

# 1. Introdução

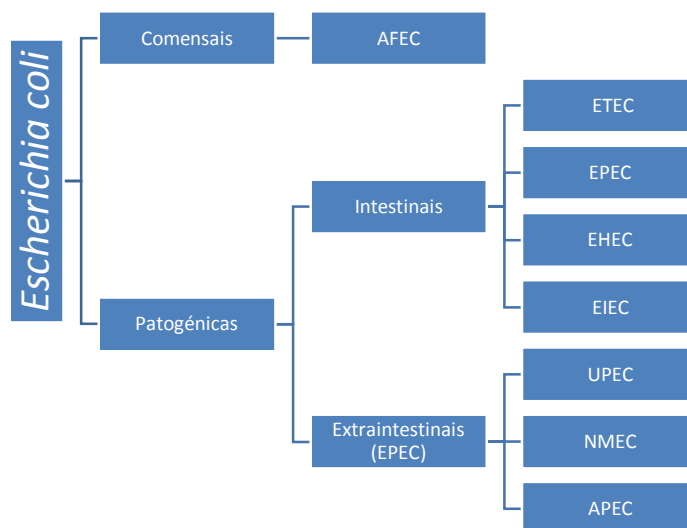
## Considerações gerais

A colibacilose é uma das mais importantes patologias de origem bacteriana na produção aviária e é responsável por graves prejuízos económicos. Apesar dos avanços nas medidas de profilaxia sanitária, estudos recentes referem um aumento da colibacilose na Europa (Ghunaim, 2014). Esta infeção é causada por estirpes de *Escherichia coli* (*E. coli*) detentoras de fatores de virulência que lhes conferem uma capacidade de adaptação a novos “nichos” ecológicos e a eclosão de um largo espetro de doenças (Dziva, 2008; Kemmet, 2013).

As bactérias do género *E. coli* colonizam o Aparelho Gastrointestinal do Homem e de várias espécies animais, como organismos comensais, tornando-se por vezes agentes oportunistas infecciosos. É de acordo com esta relação que se classificam estas bactérias em 3 subgrupos: (1) *E. coli* comensal ou não-patogénica; (2) *E. coli* patogénica que origina infeções intestinais (InPEC) e (3) *E. coli* patogénica extra-intestinal (ExPEC) (Moriel, 2010; Frömmel, 2013).

As estirpes que originam patologias intestinais subdividem-se em diversos patotipos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteropatogénica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC) e enteroinvasiva (EIEC), entre outras (Moriel, 2010).

Nas ExPEC estão incluídas as estirpes *E. Coli* Uropatogénica (UPEC) do Aparelho Urinário humano e animal, as *E. coli* neonatal meningite (NMEC) causadoras de meningite neonatal. As estirpes patogénicas de aves denominam-se *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) e as estirpes comensais, *Avian Faecal Escherichia coli* (AFEC) (Moriel, 2010). A figura 1 descreve os diferentes subgrupos de *E. coli*.



**Figura 1:** Distribuição dos diferentes patotipos de *Escherichia coli* (adaptado de Cunha, 2014).

Filogeneticamente *E. coli* divide-se em quatro grupos principais: A, B1, B2 e D. Os grupos B2 e D estão mais presentes nas patologias humanas, enquanto o grupo A é o mais frequentemente encontrado nas APEC (Bingen, 1998; Jeong, 2012). Existem cerca de 173 serogrupos de *E. coli* sendo os mais comuns, nas APEC, O2, O18 e O78, diferindo a sua prevalência de acordo com o país e o produtor. No entanto, este número de serogrupos tem vindo a aumentar (Ewers, 2003).

As APEC são bem conhecidas no meio científico e industrial, desde há muitos anos. As colibaciloses são, de facto, um importante problema económico, nas explorações aviárias, em todo o mundo, devido à elevada mortalidade e morbilidade dos bandos.

A dispneia é a sintomatologia mais frequente e as lesões mais comuns são: aerossaculite, celulite, pericardite e peri-hepatite (Kwaga, 1994; Ghunaim, 2014). O processo infeccioso, quando não tratado, termina com a morte do animal por septicémia (Dziva, 2008).

De modo a minimizar os danos económicos causados pela presença das APEC, a indústria aviária recorre à antibioterapia. Esta abordagem soluciona pontualmente o problema, mas torna-se dispendiosa para o produtor.

Paralelamente ao impacto económico na indústria, as APEC são também consideradas como o maior reservatório de resistência a antimicrobianos, podendo transmitir esta característica a outras bactérias através de plasmídeos ou outro material genético. Este facto é importante, uma vez que os diversos estudos indicam que 92% das



APEC nos Estados Unidos, na Europa e na Austrália são resistentes a três ou mais antimicrobianos (Ghunaim, 2014). Acresce, que apesar das avançadas medidas de profilaxia e dos cuidados na produção aviária, prevê-se um aumento destas resistências. Dados que sugerem a importância do controlo das APEC nas explorações aviárias, embora esta bactéria faça parte da flora comensal dos animais (Ghunaim, 2014).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o uso ponderado de antimicrobianos é emergente. A presença de resíduos destes medicamentos na cadeia alimentar, devido ao seu uso indiscriminado, potencia o aparecimento de estirpes resistentes aumentando a sua baixa eficácia com implicações na medicina humana e veterinária (Agunos, 2012). Abdi-Hachesoo, 2013 estabeleceram a relação entre a resistência a Quinolonas e Fluoroquinolonas encontradas em estirpes UPEC responsáveis por infeções do aparelho urinário humano com a existência dos genes *gyrA* e *gyrB* responsáveis pela resistência antimicrobiana nas APEC. Estes investigadores concluíram que as aves funcionam como reservatórios de bactérias resistentes e que essa resistência pode ser transmitida a humanos a partir de produtos alimentares.

Estes e outros fatores constituem a principal razão do interesse no desenvolvimento de vacinas, com estirpes patogénicas que circulam nos aviários, capazes de imunizar e garantir uma proteção eficiente dos animais. Considerando que as APEC diferem na virulência e que o desconhecimento das bases moleculares desta variabilidade é escasso, com este trabalho pretende-se identificar e caracterizar alguns dos genes de virulência de estirpes APEC isoladas de processos patológicos de galinhas reprodutoras e AFEC isoladas de fezes de frangos de carne. O conhecimento dos fatores de virulência permitirá o controlo das infeções APEC com a produção de uma vacina de rebanho que incorpore as estirpes patogénicas relevantes.

## 1.1. Fatores de Virulência

O modo pelo qual as APEC invadem o organismo não está bem estabelecido embora a via oral e respiratória pareçam ser as mais importantes (Dziva, 2008). Estas bactérias desenvolvem-se em qualquer *habitat* fora do Sistema Gastrointestinal, originando uma larga variedade de doenças. A localização, preferencialmente intestinal, permite a sua disseminação a todo o organismo animal e, através da via fecal, para o meio ambiente.

A *Escherichia coli* possui fatores de virulência que lhe permite colonizar, invadir e escapar ao sistema defensivo do hospedeiro bem como danificar os tecidos. Os genes que

codificam os fatores de virulência denominam-se por: *Virulence-Associated Genes* (VAGs) sendo os que estão associados a infecções extraintestinais *Extraintestinal Virulence-Associated Genes* (exVAGs) e os envolvidos em infecções intestinais *Intestinal Virulence-Associated Genes* (inVAGs) (Kemmet, 2013; Frömmel, 2013).

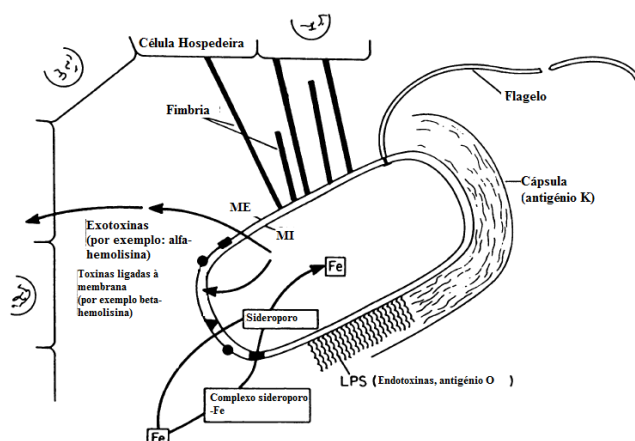
As técnicas de Biologia Molecular têm demonstrado elevada relevância na identificação dos genes envolvidos na expressão dos fatores de virulência de *E. coli* (Zhao, 2009).

**Este trabalho teve como objetivo a caracterização de genes de virulência de estirpes patogênicas de *E.coli* isoladas de galinhas reprodutoras, mortas com sintomatologia de colibacilose e pertencentes a uma exploração, e genes de estirpes saprófitas, isoladas de fezes de frangos de carne, abatidos em diversos matadouros do País. É um estudo importante que não termina com este trabalho. Caracteriza algumas estirpes virulentas possíveis candidatas à produção de uma vacina de rebanho, e estabelece ferramentas apropriadas a um diagnóstico eficaz, evitando assim o uso obsoleto da serotipificação. No presente trabalho analisámos onze genes de estirpes exVAGs: (i) *fimC*, *papC* e *tsh* com funções de adesão; (ii) *chuA*, *irp2*, *iucD* e *fyuA* com funções de captação e transporte de ferro; (iii) *cvaA/B*, *astA* e *vat* com funções de produção de toxinas e (iv) *iss*, um fator de sobrevivência sérica.**

### 1.1.1. Adesinas

De modo a colonizar o hospedeiro a *E. coli* possui um sistema de fímbrias que medeiam a ligação com as células do organismo invadido. Estas são filamentos proteicos existentes na superfície bacteriana e podem ser de diferentes tipos. Constituem estruturas semelhantes a hélices com marcante adaptabilidade que protegem a bactéria quando esta se encontra sujeita às forças provocadas pelos fluidos do hospedeiro (Mortezaei, 2013). O mecanismo de adesão das bactérias aos tecidos do hospedeiro constitui o primeiro passo na colonização e na infecção (Dziva, 2008). A figura 2 ilustra a interação entre a célula do hospedeiro e a célula bacteriana. As especificidades dos tecidos-alvo do hospedeiro determinam a expressão das fímbrias e das adesinas na superfície bacteriana (Dziva, 2008). Ultrapassada esta primeira barreira, outros mecanismos são acionados.

Neste trabalho estudamos as *Fimbriae Mannose-binding type 1* (Fim 1), *Fimbriae P* e *Temperature-sensitive haemagglutinin* (Tsh).



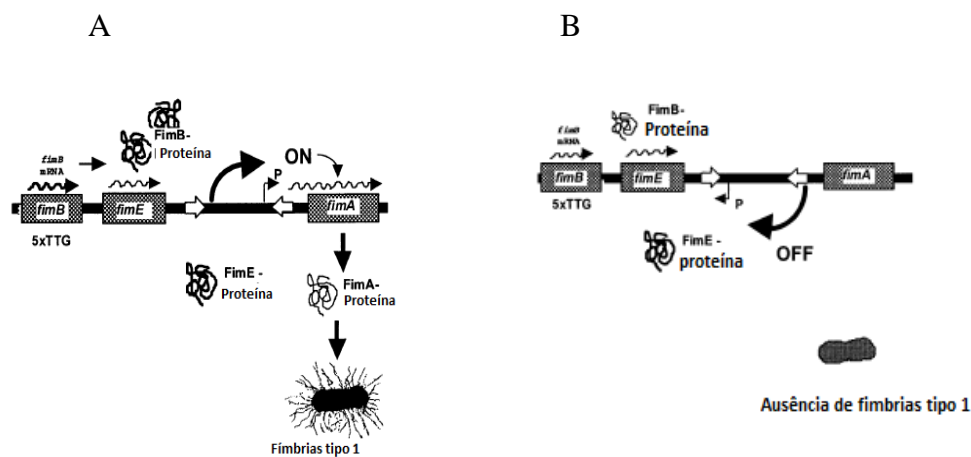
**Figura 2:** Representação da interação das *E. coli* com a célula hospedeira. ME: membrana externa, MI: membrana interna (Johnson, 1991).

### *Fimbriae Mannose-binding type 1* (Fim 1) - *fimC*

A FimC é uma proteína *chaperone*, codificada por *fimC*, um dos nove genes necessários à biossíntese das *Fimbriae Mannose-binding type 1* (Fim 1) que são as mais comuns encontradas em APEC, apresentando uma frequência de 70-100% (Dziva, 2008).

Estudos recentes indicam que 85% das estirpes com proveniência no Aparelho Gastrointestinal de humanos não apresentam esta fímbria. Estes dados sugerem que a sua presença/ausência pode representar um fator adaptativo ao hospedeiro (Pusz, 2014). Têm como principal função promover a ligação da bactéria ao resíduo D-manose das células epiteliais das mucosas das aves. São expressas maioritariamente em estirpes que colonizam a traqueia, o pulmão e os sacos aéreos, mas nunca foram isoladas em outros órgãos ou no sangue, o que comprova que estas fimbrias contribuem para a fase inicial da colonização pelo aparelho respiratório das espécies aviárias (Campos, 2005; Lymberopoulos, 2006). São codificadas pelo *cluster fim* do cromossoma bacteriano que inclui nove genes necessários à sua biossíntese: *fimA* – subunidade *major*; *fimF* e *fimG* – duas subunidades *minor*; *fimH* – fímbria sensível à manose; *fimC* – proteína *chaperone*, que ajuda na translocação da fímbria através do periplasma; *fimD* – proteína extramembranar; *fimI* – componente estrutural e *fimS* (*fim switch*) – região promotora que controla a expressão dos genes *fimA*, *fimH*, e *fimB* e *fimE*, que codificam duas recombinases específicas, as quais catalisam a expressão da Fim 1 (Bryan, 2006; Pusz, 2014).

A expressão das Fim 1 é regulada por um *switch* genético que resulta na inversão de uma região na sequência de *Deoxyribonucleic acid* (DNA) com 314 pares de bases (pb.) e que contém o promotor *fimA*. Consequentemente, *fimA* só é expresso se o *switch* ocorrer na posição certa. A figura 3 ilustra a expressão/não expressão das Fim 1. Esta capacidade de variação é um exemplo dos complexos sistemas reguladores que as estirpes patogênicas desenvolveram para alterarem o seu fenótipo como resposta ao meio ambiente do hospedeiro. Isto possibilita-lhes gerar fenótipos distintos, capazes de suplantar o sistema imunitário do organismo animal. Muitos fatores de virulência, como as fímbrias e as adesinas, apresentam esta fase de variação, e algumas bactérias patogênicas expressam, coordenadamente, mais do que uma adesina, devido a esta habilidade genética (Thattai, 2004; Graveline, 2014).

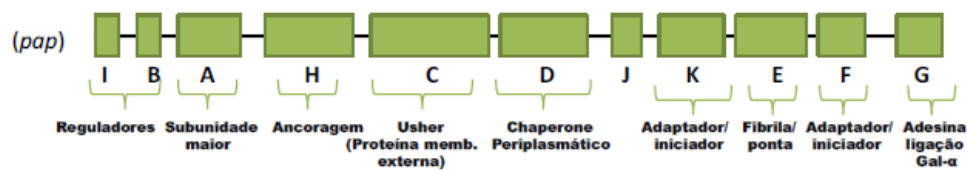


**Figura 3:** Esquema ilustrativo da transcrição e formação das Fim 1 (Adaptado de Ritter, 1997). Verifica-se que as recombinases FimB e FimE controlam a expressão de FimA que só ocorre se houver *switch* genético e se estiver na posição *on*. A recombinase FimE promove o *switch* de *on* para *off* e a recombinase FimB na direção inversa (Ritter, 1997; Snyder, 2005). Desta forma as bactérias alternam entre a fase *on* (expressão-A) e a fase *off* (não expressão-B) E a FimC promove a translocação através do periplasma (Pusz, 2014).

### *P Fimbriae* - *papC*

Outras fímbrias parecem desempenhar um papel importante na colonização dos órgãos internos do hospedeiro. A *P Fimbriae* é codificada pelo *operon pielonefrite associated pili (pap)* e promove a ligação a glicolípidos da superfície das células do hospedeiro (Babai, 2000; Lane, 2007). Tal como a fímbria Fim 1, também está sujeita a

um *switch* genético embora por um mecanismo diferente (Blyn, 1990). O *operon pap* é composto por 11 genes, sendo que seis desses, *papA*, *papE*, *papF*, *papG*, *papH* e *papK*, estão relacionados com proteínas estruturais (Cunha, 2014). Na figura 4 representam-se os genes deste *operon*. A expressão do gene *papC* da *P Fimbriae* em bactérias encontradas nos sacos aéreos e em outros órgãos internos e não na traqueia indica que esta é importante nas etapas mais avançadas da infecção (Lymberopoulos, 2006). A *P Fimbriae* induz a sinalização inflamatória aguda e promove a invasão celular quando associada à *Dr Fimbriae* (Szemiako, 2013). A *P Fimbriae* é menos presente nas APEC e mais comumente encontrada nas UPEC (Martinez, 2000; Lymberopoulos, 2006; Lane, 2007).



**Figura 4:** Organização do *operon* da *P Fimbriae* (adaptado de Cunha, 2014).

#### *Temperature-sensitive haemagglutinin* (Tsh) – *tsh*

A *Temperature-sensitive haemagglutinin* (Tsh) contribui para a etapa seguinte da infecção que inclui a colonização dos sacos aéreos, mas não contribui para uma infecção generalizada (Dozois, 2000). A Tsh pertence à família dos autotransportadores, *Immunoglobulin A protease-type*, um grupo de fatores de virulência encontrado nas *E. coli*. Estes autotransportadores são proteínas que contêm uma sequência N-terminal, inserida na membrana, domínio *passenger*, que determina a atividade virulenta da proteína e uma região C-terminal, domínio  $\beta$ , com função de autotransportador ancorado à membrana externa (Leyton, 2011; McWilliams, 2014; Roman-Hernandez, 2014). Uma das características da Tsh é a sua capacidade para se ligar aos glóbulos vermelhos e a outras proteínas da matriz extracelular, tais como, a fibronectina e o colagénio IV (Stathopoulos, 1999; Dziva, 2008).

A expressão de diversas proteínas com importância na virulência é termorregulada, isto é, ocorre apenas quando a temperatura é a ideal. Diversos estudos demonstraram a ausência da Tsh a 21 e a 42 °C, e a sua presença a 37 °C (Parreira, 2003). É importante salientar que o gene *tsh*, que codifica esta proteína não foi detetado em *E. coli* proveniente de fezes de galinhas saudáveis, AFEC, mas sim em APEC. Esta ocorrência sugere um importante papel deste fator de virulência na patogenicidade daquelas estirpes APEC

(Kobayashi, 2010). A Tsh é uma proteína com 140 kDa, que é processada no periplasma, originando uma aglutinina de 33 kDa e um fragmento extracelular de 106 kDa (domínio secretor - TSH $\alpha$ ) com atividade de mucinase (serina protease) (Dziva, 2008; Kobayashi, 2010). A fração mais pequena de 33 kDa é uma proteína de membrana externa que corresponde ao domínio  $\beta$  da Tsh (Tsh $\beta$ ) (Dozois, 2000; Kobayashi, 2010). Esta proteína fica localizada temporariamente na membrana externa pois medeia a adesão durante a infeção, sendo posteriormente libertada no meio extracelular. Estes dados sugerem que a Tsh contribui para o desenvolvimento da doença não apenas quando está ligada à superfície bacteriana mas também depois de ser excretada, o que implica que esta proteína possa exercer uma ação prolongada na infeção (Kostakioti, 2004).

Existem outras adesinas presentes nas APEC tais como, a EspP e a EspC ou Intimina, entre outras. Contudo, as mencionadas anteriormente são as de maior importância na diferenciação entre estirpes virulentas e não virulentas.

### 1.1.2. Sistemas de Aquisição e Transporte de Ferro

A capacidade das APEC para capturar os iões de ferro dos fluidos corporais é uma característica importante na virulência. O ferro é um elemento essencial para a sobrevivência bacteriana. Este ião está envolvido em diversas atividades, tais como: reações de oxi-redução (aceitando e doando eletrões), transporte de eletrões e biossíntese de nucleótidos. Cada sistema bacteriano de captação de ferro possui características específicas, que incluem a síntese de recetores, a secreção e a receção na superfície da membrana externa, a internalização e a libertação do ferro no citoplasma (Gao, 2012; Troxel, 2013).

Pelo facto das concentrações extraintestinais de ferro serem baixas, as bactérias desenvolveram mecanismos diretos e indiretos que lhes permitem capturá-lo a partir das células hospedeiras (Suits, 2009; Gao, 2012). A forma direta consiste em capturá-lo a partir do grupo heme livre, ou de proteínas com grupo heme (hemoglobina ou hemopexina) (Gao, 2012). Esta forma de capturar ferro apresenta a desvantagem de que cada fonte requer um recetor específico. Uma vez que as fontes de ferro alternam de acordo com o local no hospedeiro, os microrganismos que apresentam uma diversidade alargada de recetores diretos têm uma maior capacidade de colonizar diferentes ambientes. A forma indireta pela qual as *E. coli* capturam ferro baseia-se num mecanismo de transporte que usa pequenas moléculas denominadas de sideróforos tais como quelantes de ferro de alta afinidade, como

a enterobactina (catecol como ligante), a salmoquelina, a aerobactina (ácido hidroxâmico e ácido  $\alpha$ -hidroxicarboxílico como ligante) e a yersiniabactina (Benite, 2002; Gao, 2012).

Acresce que o elevado poder redox do ferro obriga a que as bactérias controlem cuidadosamente as suas quantidades internas. Este pode ser armazenado em proteínas que limitam o potencial do ferro para criar radicais livres e protegem as células do *stress* oxidativo, criando assim uma reserva que pode ser utilizada em qualquer altura. As bactérias armazenam o ferro em três tipos de proteínas: ferritina, bacterioferritina e proteínas Dps (*DNA-protecting protein*) (Cassat, 2013; Porcheron, 2013).

Quando as concentrações de ferro são baixas os sideróforos são sintetizados e secretados no meio extracelular, onde se ligam à forma férrica. No interior da célula o sideróforo ligado ao ferro pode ser libertado por degradação enzimática, pela ação da ferrisiderofo redutase, ou por redução do ferro na forma Fe (III) para Fe (II) que destabiliza o complexo ferro-sideróforo (Miethke, 2007).

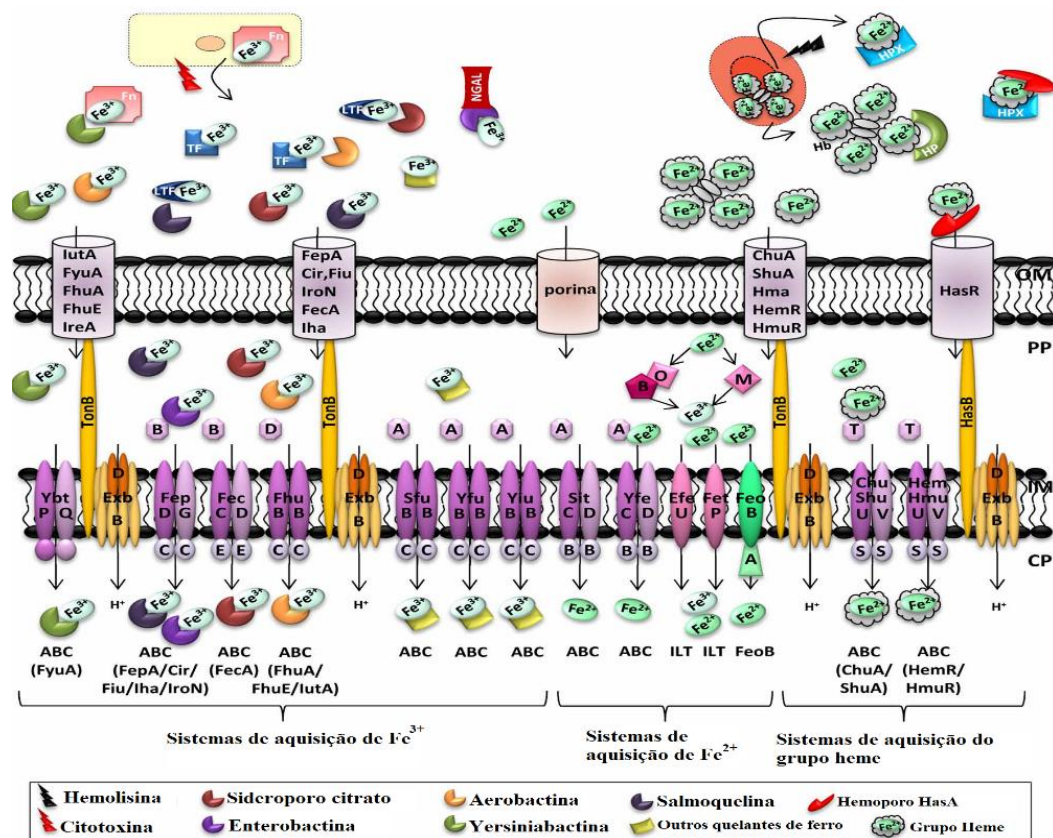
Dada a capacidade que os sideróforos têm de interferir com a homeostase do ferro do hospedeiro, o Sistema Imuninátio dos animais desenvolveu mecanismos para neutralizar os Sistemas de Aquisição de Ferro das bactérias, nomeadamente, ao nível da produção de lactoferrina nos macrófagos, com alta afinidade para o ferro (dois sítios de ligação ao ferro). Desta forma, os microrganismos dependentes de ferro podem manter uma vantagem competitiva relativamente ao hospedeiro se, de forma adaptativa, conseguirem adquirir mais sistemas de aquisição de ferro (Cassat, 2013).

Neste âmbito estudámos os genes: *E. coli hemeutilization protein A (chuA)*, *iron-uptake systems of E. coli (iucD)*, *ferric yersiniabactin uptake (fyuA)* e *Stable high-molecular-weight proteins 2 – HMWP2 (irp2)*.

#### *E. coli hemeutilization protein A – ChuA (chuA)*

Embora os sistemas de aquisição de ferro contribuam para a virulência das *E. coli* existem evidências que aqueles o fazem de forma distinta. Os recetores específicos na superfície bacteriana *heme acquisition protein-Hma* e *E. coli hemeutilization protein A-ChuA* ligam-se às hemoproteínas do hospedeiro e transferem o grupo Heme para o periplasma e o sistema de transporte *adenosine triphosphate (ATP)-binding cassett (ABC)* liberta-o no citoplasma. Este sistema pode ser explicado da seguinte forma: uma vez capturado pelo recetor ChuA e transportado através da membrana para o periplasma, o heme é internalizado e ligado a proteínas periplasmáticas de transporte, específicas do

heme, *E. coli hemeutilization transporter protein* (ChuT), por exemplo. Estas proteínas medeiam o seu transporte para o citoplasma através dos transportadores ABC (Hagan, 2009; Gao, 2012). Na figura 5 estão descritos alguns dos sistemas bacterianos de aquisição de ferro. O grupo Heme captado através do recetor *ChuA* desempenha um papel importante, nas UPEC, contribuindo para a virulência na colonização do rim (Garcia, 2011). Esta proteína, codificada pelo gene *chuA*, é uma *outer membrane protein* (OMP) de 69 kDa. A sequência nucleotídica deste gene apresenta uma elevada homologia com outro gene, *shuA*, que faz parte de um *locus* com oito *open reading frames* (ORFs) denominado *heme transport locus* que está amplamente distribuído nas *E. coli* e que contribui para a sua virulência (Nagy, 2001; Kouse, 2013). Kouse, 2013 determinaram que a expressão destes dois genes é termorregulada.



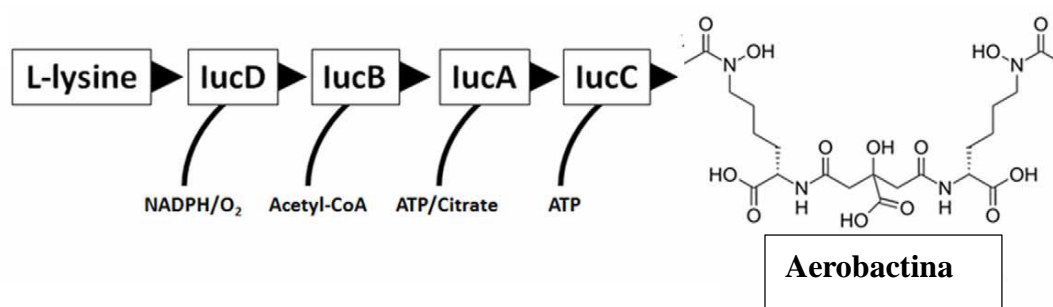
**Figura 5:** Sistemas de captura de ferro em *E. coli* (Porcheron, 2013).

### *Iron-uptake systems of E.coli – Iuc (iucD)*

Os quatro genes *iron-uptake systems of E. coli* (*iucABCD*), que estão representados na figura 6, estão envolvidos na biossíntese de uma aerobactina, enquanto o gene *iutA*



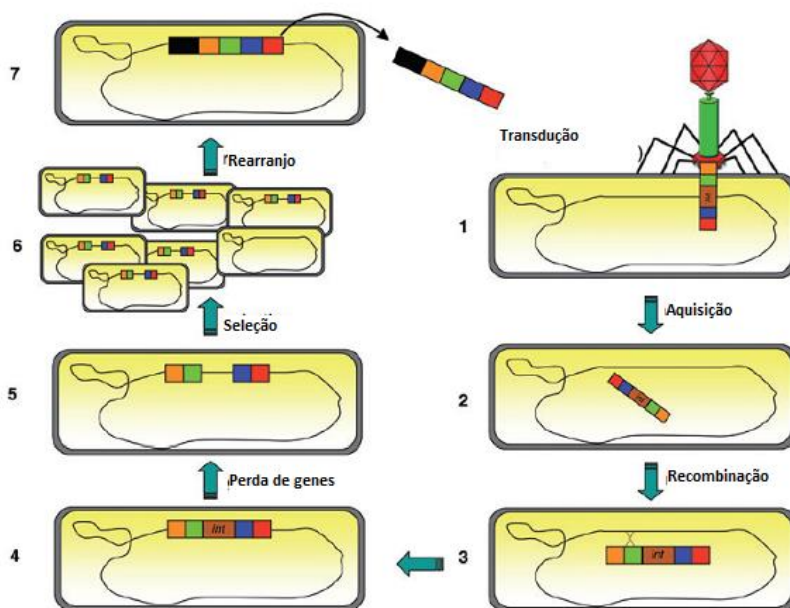
codifica uma ferri-aerobactina (receptor da membrana externa) (Tiariath, 1993). O gene *iucD* codifica um enzima, lisina:N<sup>6</sup>-hidroxilase, que catalisa o primeiro passo na síntese da aerobactina (Tiariath, 1993). Esta aerobactina é um exemplo dos sideróforos não produzidos pela via *non-ribosomal peptide synthesis* (NRPS) (Troxell, 2013). Os genes da aerobactina estão presentes nas estirpes virulentas e ausentes nas estirpes não virulentas por isso são considerados importantes no desenrolar da patogenicidade das APEC. Os cinco genes que codificam a aerobactina, *iucABCD* e *iutA*, estão localizados num *operon* que está presente no plasmídeo CoIV (Ling, 2013).



**Figura 6:** Organização dos genes *iucABCD* necessários à síntese da aerobactina. A atividade enzimática sequencial de IucD, IucC e IucA converte a L-lisina na aerobactina, um importante captador de ferro (adaptado de Troxell, 2013).

#### *Ferric yersiniabactin uptake (FyuA) - fyuA*

O gene *ferric yersiniabactin uptake (fyuA)* é um importante gene envolvido na aquisição de ferro. É codificado numa Ilha Associada à Patogenicidade (PAI). Estas PAI incorporam genes com diferentes funções de elevada importância na patogenicidade, tais como fatores de adesão, sideróforos, exotoxinas, invasinas ou sistemas de secreção, que estão ausentes nas estirpes não-patogénicas. As PAI representam bem o modo como as bactérias Gram-negativas adquirem genes associados à virulência como forma adaptativa (Gal-Mor, 2006). A figura 7 ilustra os mecanismos envolvidos nessa aquisição.



**Figura 7:** Diferentes etapas na aquisição das PAI. (1) Um elemento genético é adquirido através de transferência horizontal (bacteriófago) (2) seguido da aquisição com sucesso; (3) recombinação mediada por recombinases; (4) integração do elemento no cromossoma; (5) perda de genes que possibilitam a integração das PAI no cromossoma. Esta aquisição confere alguma vantagem seletiva; (6) que é transmitida às novas gerações; (7) e disseminada no meio ambiente para outros microrganismos (adaptado de Gal-Mor, 2006).

O gene *fyuA* codifica uma proteína de membrana externa com 71 kDa, que atua como um sideróforo (Hancock, 2008). É partilhado entre as *Enterobacteriaceae spp.*, como a *Yersinia spp.*. As *E. coli* carregam genes com sequências idênticas aos das *Yersinia spp.*, tais como *iron-repressible proteins 2 (irp2)* e *fyuA*, o que indica uma hipotética disseminação das PAI pelas espécies de *Enterobacteriaceae spp* e em especial nas *E. coli*. Num estudo desenvolvido por Schubert, 1998 foi detetado o *cluster irp2-fyuA* em 93% de EAEC e em 27% de EIEC (Schubert, 1998). Isto sugere que a aquisição de ferro pode não ser a razão principal para a disseminação destes genes. Para além desta função os produtos dos genes *fyuA-irp2* proporcionam, entre outros efeitos, danos citotóxicos nas células T ao nível do Sistema Imunitário do hospedeiro (Schubert, 1998).

### *Iron-repressible proteins 2 (irp2)*

O produto do gene *irp2*, *Stable High-Molecular-Weight Proteins 2 (HMWP2)* é similar à superfamília de enzimas, *adenylate-formming*, envolvidos na síntese do péptido *nonribosomal* dos sideróforos (Xu, 2000). Esta proteína com 190 kDa não possui a

sequência terminal peptídica de sinal característica das OMPs. Além disso, tem duas pequenas sequências de aminoácidos hidrofóbicos (resíduos 630-648 e 1729-1744) que promovem a inserção e determinam a especificidade para a membrana citoplasmática (Guilvoul, 1995; Xu, 2000).

Existem outros genes que codificam Sistemas de Aquisição de Ferro nas APEC, tais como *ironN*, *hma*, *fhuE*, entre outros. Os genes previamente descritos são os de maior importância na virulência destas estirpes.

### 1.1.3. Sobrevivência Sérica

A resistência ao sistema do complemento do hospedeiro e a resistência à fagocitose desempenham um papel importante na virulência das APEC. O sistema do complemento constitui a primeira linha de defesa do organismo animal e atua sobre a membrana externa das bactérias, originando a sua morte diretamente através da formação de poros na membrana celular, o que conduz à lise bacteriana (Huja, 2014). Alguns dos constituintes da ME das bactérias Gram-negativas, nomeadamente o Lipopolissacárido (LPS) e as OMPs impedem a destruição pelo sistema do complemento .

#### *Increased serum survival (Iss) - iss*

Também o produto do gene *increased serum survival (iss)*, a proteína de membrana Iss, interfere com a atividade do sistema do complemento, porque inativa a sua componente solúvel, impedindo a formação do *membrane attack complex* (MAC), e aumentando assim a resistência sérica da *E. coli*, em especial das APEC (Lynne, 2006; Dziva, 2008).

Embora, estudos recentes apontem para um papel de menor importância do gene *iss* na resistência sérica da bactéria, a sua presença parece ser importante para o desencadear dos mecanismos de virulência (Tivendale, 2004; Johnson, 2008). A proteína Iss é uma lipoproteína de 10 a 11 kDa inserida na membrana externa e apresenta 90% de similaridade com a proteína Bor (Lynne, 2007; Baptista, 2010). A recente sequenciação do gene *iss* revelou a presença de 3 alelos geneticamente distintos, o que permitiu a distinção de 3 tipos de proteínas Iss (tipos 1,2 e 3), possibilitando a discriminação dos patótipos de *E. coli* (Baptista, 2010). O gene *iss* está localizado na região conservada da PAI, do plasmídeo ColV/BM, que está relacionada com as APEC (Johnson, 2002; Johnson, 2008).

Existem outras proteínas envolvidas na sobrevivência sérica, que estão presentes nas APEC, tais como, TraT, OmpT, OmpA, K1, IbaE, IbaA, entre outras. A proteína Iss, referida anteriormente, é a de maior importância na virulência das APEC.

#### 1.1.4. Toxinas

A *Escherichia coli* produz uma série de toxinas associadas a sistemas que introduzem moléculas na célula hospedeira, contribuindo para a patogenicidade (Wiles, 2008). A produção de toxinas constitui um passo importante no desenvolvimento da bacteriemia. Neste âmbito estudamos os seguintes genes: *Vacuolating Autotransporter Toxin (vat)*, *EAggEC heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) – (astA)* e *Colicin V (cvaA/B)*.

##### *Vacuolating Autotransporter Toxin (VAT) - vat*

A toxina *Vacuolating Autotransporter Toxin (VAT)* pertence ao tipo V e é simultaneamente secretora e autotransportadora. Esta toxina é caracterizada por conduzir a uma série de efeitos citopáticos nas células alvo os quais incluem o *swelling* e a vacuolização. Embora ainda não esteja bem estudada sabe-se que desempenha um papel ativo na virulência das APEC do aparelho respiratório de galinhas reprodutoras (Wiles, 2008).

Estruturalmente a toxina VAT apresenta uma sequência N-terminal e um péptido de sinal de clivagem com 5,7 kDa entre os aminoácidos 55 e 56. O seu domínio C-terminal com 30,5kDa, contém 14 aminoácidos  $\beta$ -anfipáticos característicos da família dos autotransportadores (Parreira, 2003). A toxina Vat e a hemaglutinina Tsh apresentam uma similaridade de 78% de aminoácidos o que tem levado à confusão entre estas duas proteínas (Spurbeck, 2012). Estudos genéticos revelaram que a toxina Vat é codificada numa ilha genómica conservada com 7,8 kb no *locus thrWtRNA*, (Parreira, 2003; Parham, 2005). Esta conservação genética num conjunto de estirpes patogénicas permitiu concluir que a Vat é importante no mecanismo de virulência da *E.coli*. Esta hipótese é suportada pelo facto desta toxina ser essencial na invasão dos tecidos do hospedeiro (Parham, 2005).

### EAggEC heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) - astA

Outra toxina associada às APEC e que contribui para a patologia denomina-se por EAggEC heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) (Dziva, 2008; Oh, 2014). A toxina EAST1 é codificada pelo gene *arginine succinyltransferase A* (*astA*) (Janben 2001; Oh, 2014). Esta é um péptido pequeno que ativa a guanilciclase, levando ao aumento de produção intracelular de *guanosine monophosphate cyclic* (GMPc) (Savarino, 1993). A presença desta toxina desencadeia alterações nas vias de sinalização celular que culminam no aumento da secreção de cloro e consequente diarreia aquosa característica das colibaciloses (Janben, 2001).

### Colicin V (ColV) – cvaA/B

A *Colicin V* (ColV) é um sistema de toxinas com 90 kDa presente em muitas *Enterobacteriaceae*. É codificada por 4 genes presentes em dois *operon* convergentes, um com os genes *cvi* e *cvaC* e outro com os genes *cvaA* e *cvaB*. O produto do gene *cvi* confere imunidade à célula que produz a toxina ColV que por sua vez é codificada pelo gene *cvaC*. Aquela toxina é processada como uma proteína com 103 aminoácidos sem o típico péptido de sinal uma vez que para ser secretada é-lhe removida a porção N-terminal com 15 aminoácidos. Adicionalmente, o sistema de transporte é codificado pelo *operon cvaA/B*. O transportador CvaB tem 6 domínios transmembranares e constitui o sistema de transporte *ATP-binding cassette* propriamente dito com uma porção C-terminal da região citoplasmática. A proteína CvaA está ancorada na membrana interna e tem um domínio N-terminal hidrofóbico. É membro da família *membrane fusion protein* (MFP) que funcionam como permeases e atuam como os sistemas de transporte ABC. O transportador CvaB liga-se à proteína CvaA através de um sistema de proteínas de membrana externa, Tol (C, Q, R, A), que contribui para a secreção da toxina ColV e para a integridade do complexo (Hwang, 1997; Guo, 2006; Housden, 2012).

Existem outros genes que codificam toxinas envolvidas na virulência das APEC, tais como *stx*, *sat*, *ehxA*, *e-hlyA*, *sheA*, *eltAB*, entre outros. Contudo as toxinas mencionadas anteriormente são as de maior importância na diferenciação entre APEC e AFEC.

## 2. Hipótese e Objetivos

O presente trabalho é parte de uma linha de investigação dedicada ao estudo do perfil dos genes de virulência de estirpes de *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) envolvidas em processos patológicos de galinhas reprodutoras e de *Avian Fecal Escherichia coli* (AFEC) provenientes de frangos de carne abatidos em matadouros.

Investigações anteriores indicam que a distribuição dos vários fatores de virulência são úteis marcadores para a deteção e caracterização das APEC, podendo ser utilizados no diagnóstico de colibacilose em aves. Embora a *Escherichia coli* faça parte da flora comensal das aves, o seu controlo é importante nas explorações aviárias. De facto, o aumento do conhecimento do perfil genético das estirpes de *Escherichia coli* aviárias através da quantificação e qualificação de alguns dos genes de virulência permitirá, a produção de uma vacina de rebanho e a consequente redução da administração de antimicrobianos. Com o presente trabalho pretende-se contribuir para a diminuição dos custos de produção das explorações aviárias e aumentar a sua biossegurança.

## 3. Procedimento experimental

### 3.1. Estirpes Bacterianas e condições de crescimento

Um total de 127 estirpes de *E. coli* foram incluídas neste estudo. Sessenta e seis provenientes de galinhas reprodutoras, da espécie *Gallus gallus*, mortas com sinais clínicos de colibacilose (APEC) provenientes de uma exploração e 61 isoladas de fezes colhidas de cecos de frangos de carne (AFEC) abatidos em matadouros distribuídos por todo o País.

As APEC foram isoladas de fígado, baço e, quando presente, líquido ascítico e chegaram ao laboratório sementeadas em placas de agar sangue. As AFEC foram isoladas no laboratório do Departamento de Bacteriologia da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Saúde e Produção Animal (UEISPSA), e mantiveram-se congeladas em meio de conservação (glicerol).

As estirpes de referência ATCC 25922 do GenBanc n.º CP009072, pertencente ao serogrupo O6, e a EF 135 (EURL *E. coli* – European Reference Laboratory for *E. coli*, Itália), pertencente ao serogrupo O2, foram utilizadas como controlos positivos para validação das provas de *Multiplex Polymerase Chain Reaction* (PCR-Multiplex).

Todas as estirpes, mantidas congeladas (-20°C) em glicerol eram repicadas em meio de *Trypticase Soja Agar* (Oxoid, Reino Unido) e incubadas a 37 °C em aerobiose, *overnight*.

### 3.2. Serotipificação

As 66 APEC isoladas foram testadas, por aglutinação rápida, com antissoros comerciais (Sinfon, Alemanha) de antigénios somáticos O78, O18 e O2. As estirpes com aglutinação negativa consideraram-se pertencentes a outros serotipos. Em simultâneo, foram testadas com soro fisiológico para “despiste” de falsos positivos. O procedimento está descrito no Anexo A.

### 3.3. Preparação de DNA

Na obtenção de DNA bacteriano utilizámos, o método de extração simples para todas as estirpes a partir de uma colónia isolada de uma cultura com 24 horas, sementeada em meio de *Trypticase Soja Agar* (Oxoid, Reino Unido)

A quantificação do DNA foi efetuada por Espectrofotometria de Absorção Molecular com um comprimento de onda de 260 nm. A integridade e pureza do do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v). O procedimento está descrito no Anexo B.

### 3.4. PCR-multiplex

Os PCR-Multiplex utilizados (PCR1 e PCR2) foram baseados no método desenvolvido por Ewers, 2005 e teve como objetivo detetar a presença dos genes de virulência: *astA*, *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *vat* e *cvaA/B* (PCR1) e *chuA*, *fyuA* e *fimC* (PCR2)

Na PCR1 as sequências *Forward* (F) e *Reverse* (R) dos oligonucleotidos iniciadores (OIs ou *Primers*) utilizados na amplificação foram desenhados em estudos anteriores realizados por Ewers, 2005 (tabela 1). A metodologia da PCR2 foi adaptada da anterior. A sequência *Forward* (F) e *Reverse* (R) dos *Primers* utilizados na amplificação, foram desenhados de estudos anteriores e estão descritos na tabela 1.

Os *primers* foram adquiridos liofilizados e diluídos em água ultrapura estéril, de acordo com as instruções do fabricante. Para cada *primer* preparou-se uma solução *stock* com uma concentração de 100 pmol/uL e uma solução de trabalho a 10 pmol/uL que se mantiveram armazenados a -20 °C até à sua utilização.



**Tabela 1:** Sequências e especificidades dos *primers* utilizados nas PCR-Multiplex 1 e 2 e tamanho dos seus produtos.

Gene	Sequência do <i>Primer</i> (5' – 3')	Localização no gene	Gene Bank Acc.-No.	Tamanho (pares de bases p.b.)	Referências
<i>astA</i> *	F: TGCCATCAACACAGTATATCC R: TCAGGTCGCGAGTGACGGC	797-817 912-894	AF143819	116	Ewers, 2005
<i>iss</i> *	F: ATCACATAGGATTCTGCCG R: CAGCGGAGTATAGATGCCA	(-)10.(-)28 282-264	X52665	309	Ewers, 2005
<i>irp2</i> *	F: AAGGATTCGCTGTTACCGGAC R: AACTCCTGATACAGGTGGC	22-42 434-416	L18881	413	Ewers, 2005
<i>papC</i> *	F: TGATATCACGCAGTCAGTAGC R: CCGGCCATATTCACATAA	1284-1304 1784-1767	Y00529	501	Ewers, 2005
<i>iucD</i> *	F: ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC R: CCTGATCCAGCTGATGCTC	239-259 952-934	M18968	714	Ewers, 2005
<i>tsh</i> *	F: ACTATTCTCTGCAGGAAGTC R: CTTCGATGTTCTGAACGT	132-151 955-937	AF218073	824	Ewers, 2005
<i>vat</i> *	F: TCCTGGGACATAATGGTCAG R: GTGTCAGAACGGAATTGT	1076-1095 2056-2038	AY151282	981	Ewers, 2005
<i>cva</i> <i>A/B</i> *	F: TGGTAGAATGTGCCAGAGCAAG R: GAGCTGTTTGTAGCGAAGCC	10745- 10764 11925- 11904	AJ223631	1181	Ewers, 2005
<i>chuA</i> *	F: GACGAACCAACGGTCAGGATACG R: CAGTAGGCACGATGTTGT	7539-1559	-	279	Clermont, 2000
<i>fyuA</i> **	F: GCGACGGGAAGCGATGACTTA R: CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	786-806	Z38064	774	Ewers, 2004
<i>fimC</i> **	F: GGGTAGAAAATGCCGATGGTG R: CGTCATTTTGGGGGTAAGTGC	215-235 711-691	Z37500	477	Ewers, 2004

\* genes utilizados no multiplex- PCR1

\*\* genes utilizados no multiplex-PCR2

Para a análise do perfil dos genes de virulência por PCR-Multiplex 1 e 2 seguiu-se o seguinte protocolo: 2 µL de DNA, de cada estirpe em estudo e das de referência, com uma concentração média de 117 ng/µL, foram adicionados à mistura de reação (25 µL). Esta mistura continha 0,1 µL de cada par de *primers* (100 pmol) (Invitrogen, EUA), 1 µL da mistura de deoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs) (*deoxycytidine triphosphate*-dCTP, *deoxyguanosine triphosphate*-dGTP, *deoxythymidine triphosphate*-dTTP, *deoxyadenosine*

*triphosphate-dATP*) (10 mM) (Promega, EUA), 2,5 µL de tampão de PCR (10X) (Promega, EUA), 2 µL de Cloreto de Magnésio (50 mM) (Promega EUA) e 2 unidades de Taq-polimerase (Promega, EUA). Todos os reagentes mantinham-se armazenados a -20 °C até à sua utilização. A amplificação decorreu no termociclador (BioRad, EUA) com as seguintes condições: *Desnaturação* ( $t_1$ ), 3 min a 94°C; *Desnaturação* ( $t_2$ ), 30 s a 94 °C; *Hibridação* ( $t_3$ ), 30 s a 58 °C; *Extensão* ( $t_4$ ), 3 min a 68 °C (ciclos de  $t_2$ - $t_4$  repetidos 25 vezes); *Finalização* ( $t_5$ ), 10 min a 72 °C.

A reprodutibilidade dos resultados destes PCR-Multiplex foi confirmada repetindo os procedimentos duas vezes usando a mesma preparação de DNA provenientes das 127 estirpes testadas. O procedimento está descrito no Anexo C.

### 3.5. Separação dos fragmentos resultantes da amplificação

Os produtos resultantes da amplificação por PCR-Multiplex foram separados por eletroforese em gel de agarose (Acros, Bélgica) a 2% (m/v) com brometo de etídeo (10 mg/mL) (Invitrogen, EUA) com um marcador molecular com intervalos de 100 pb. (Nzytech, Portugal). A separação ocorreu em tina de electroforese (Compact L/XL biometra, Alemanha) com tampão TBE (1X) e com uma voltagem de 220 V durante 2 horas. O procedimento está descrito no Anexo D.

Os resultados foram observados em transiluminador (Uvitec, Reino Unido) com ultravioleta (UV) com um comprimento de onda de 302 nm.

### 3.6. Análise estatística

As frequências e percentagens dos genes de virulência foram comparadas utilizando o teste de *chi-square* (com um intervalo de confiança de 95%) entre as estirpes isoladas de animais mortos com suspeita de colibacilose (APEC) e as estirpes isoladas de animais saudáveis (AFEC) colhidas em matadouros. Os valores de *p* inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram analisados usando

os programas informáticos *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS versão 25, IBM, EUA) e *Excel* (Microsoft, EUA).

### 3.7. Análise de agrupamento

A análise foi efetuada para cada estirpe APEC e AFEC e os resultados obtidos por PCR foram transformados numa matriz de dados binários (presença/ausência) e analisados como um conjunto de caracteres utilizando-se o programa informático Bionumerics (Applied Maths, Bélgica). Para construção do dendrograma, a cada gene foi atribuído o mesmo peso e as estirpes foram associadas numa matriz aplicando o coeficiente de similaridade *simple matching* (SM). O agrupamento das estirpes foi efetuado pelo método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (UPGMA, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*).

## 4. Resultados

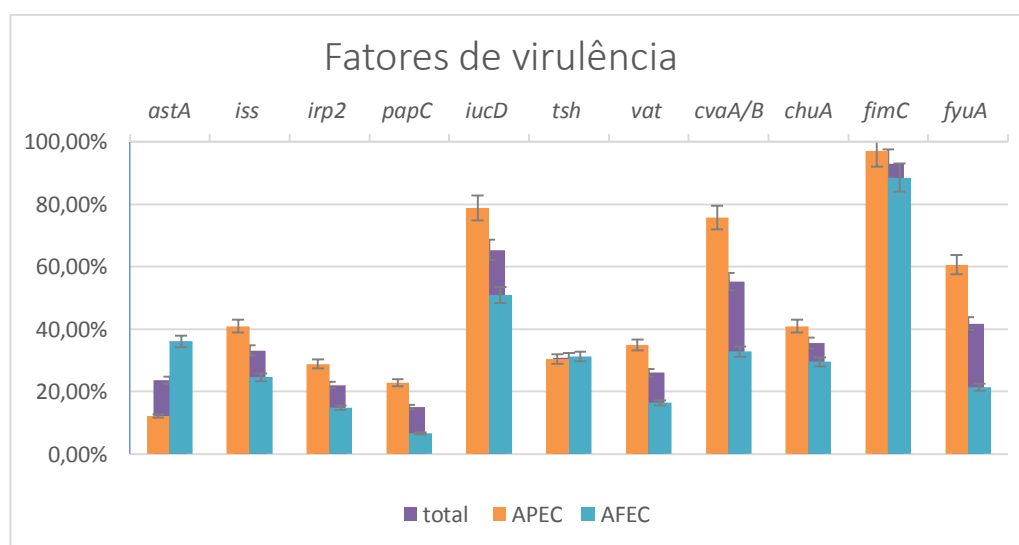
### 4.1. Serotipificação

Das 127 estirpes de *Escherichia coli* apenas as APEC (66) foram sujeitas a testes de serotipificação. Este grupo foi testado com antissoros específicos para os serogrupos, O2, O18 e O78. Todas as estirpes que não demonstraram positividade nos serogrupos testados foram consideradas como pertencentes a outros serogrupos e classificadas como não-tipificadas. O serogrupo O78 foi o mais frequentemente observado (57,58%, 38/66) seguido dos serogrupos O2 (4,55%, 3/66) e O18 (3,03%, 2/66). As estirpes classificadas como não-tipificadas apresentaram uma frequência de 34,85% (23/66).

### 4.2. Perfil dos genes de virulência

Para a pesquisa dos 11 *Virulence-Associated Genes* (VAGs) foram testadas 127 amostras de *Escherichia coli*. No gráfico 1 sumariza-se e na tabela 2 apresentam-se as frequências obtidas para as estirpes em estudo. A maioria dos isolados, quer APEC quer AFEC, possuem o gene *fimC* (92,91%, 118/127). O gene *papC* apresentou a frequência mais baixa nas AFEC e o gene *astA* nas APEC.

Todos os VAGs apresentaram uma maior frequência nas estirpes APEC, à exceção do gene *astA*, que apresentou uma maior prevalência nas AFEC.



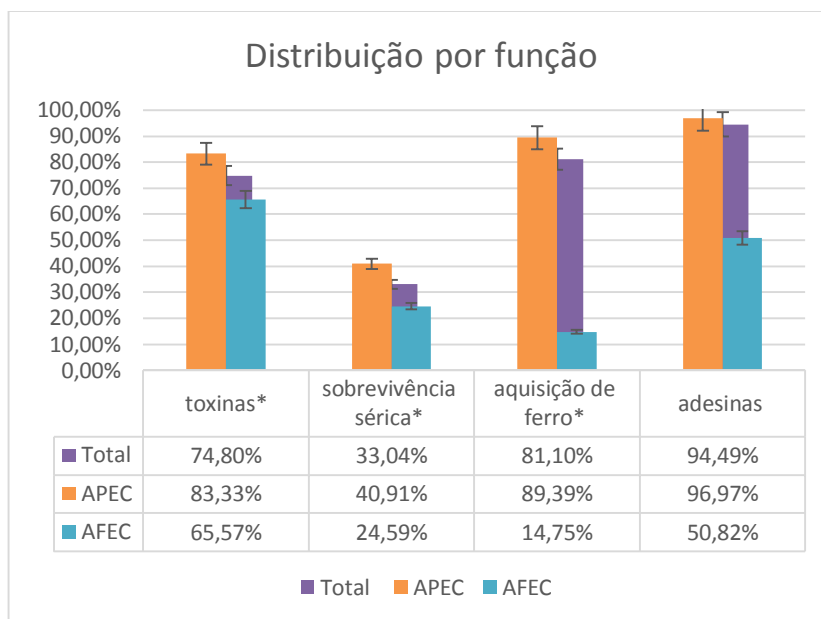
**Gráfico 1:** Comparação da prevalência de VAGs nas estirpes APEC e AFEC.

**Tabela 2:** Prevalência dos VAG nas estirpes isoladas.

Genes	Total de estirpes (n = 127)		APEC (n =66)		AFEC (n =61)		p-value
	Número de isolados	Porcentagem	Número de isolados	Porcentagem	Número de isolados	Porcentagem	
<b>Adesina</b>							
<i>papC</i>	19,00	14,96%	15,00	22,73%	4,00	6,56%	0,01*
<i>fimC</i>	118,00	92,91%	64,00	96,97%	54,00	88,52%	0,06
<i>tsh</i>	39,00	30,70%	20,00	30,30%	19,00	31,15%	0,92
<b>Toxinas</b>							
<i>vat</i>	33,00	25,98%	23,00	34,85%	10,00	16,39%	0,02*
<i>astA</i>	30,00	23,62%	8,00	12,12%	22,00	36,07%	0,00*
<i>cvaA/B</i>	70,00	55,12%	50,00	75,76%	20,00	32,79%	0,00*
<b>Sistemas de aquisição de ferro</b>							
<i>iucD</i>	83,00	65,35%	52,00	78,79%	31,00	50,82%	0,00*
<i>irp2</i>	28,00	22,05%	19,00	28,79%	9,00	14,75%	0,05
<i>fyuA</i>	53,00	41,73%	40,00	60,60%	13,00	21,31%	0,00*
<i>chuA</i>	45,00	35,43%	27,00	40,90%	18,00	29,50%	0,18
<b>Resistência sérica</b>							
<i>iss</i>	42,00	33,07%	27,00	40,90%	15,00	24,59%	0,05*

\* p-value  $\leq 0,05$  calculado pelo teste de *chi-square*, indica uma diferença estatisticamente significativa entre as APEC e as AFEC.

Agrupando os dados obtidos por função dos genes estudados, nomeadamente adesinas (*papC*, *fimC* e *tsh*), sistemas de aquisição de ferro (*iucD*, *irp2*, *chuA* e *fyuA*), sobrevivência séria (*iss*) e toxinas (*vat*, *astA* e *cvaA/B*), verificou-se que a maioria das estirpes possuem adesinas (94,49%, 120/127). As APEC apresentaram uma frequência de adesinas de 96,97% (64/66) e as AFEC 50,82% (31/61). Verificou-se ainda que, para todas as funções, as APEC apresentavam sempre uma maior frequência, como se pode verificar no gráfico 2.



\*  $p$ -value  $\leq 0,05$  calculado pelo teste de *chi-square*, indica uma diferença significativa entre as APEC e as AFEC.

**Gráfico 2:** Distribuição por função dos genes estudados nas duas populações e no total das estirpes.

### 4.3. Perfil dos genes de virulência/serogrupo

Na análise dos dados obtidos na serotipificação e no estudo do perfil genético das estirpes verificou-se que em todos os serogrupos a presença do *fimC* era a mais elevada que os outros genes. A tabela 3 resume os resultados obtidos por serogrupo.

**Tabela 3:** Prevalência dos VAGs nos serogrupos O78, O2 e O18.

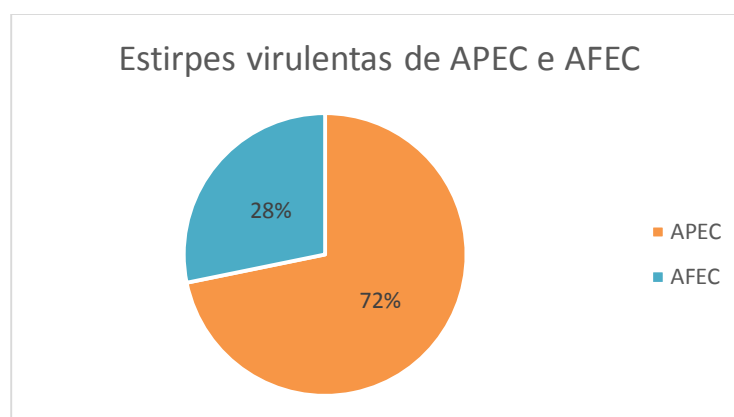
	O78 (n =38)		O2 (n =3)		O18 (n =2)		Não tipificadas (n =23)	
Genes								
<b>Adesina</b>	Número de isolados	Porcentagem	Número de isolados	Porcentagem	Número de isolados	Porcentagem	Número de isolados	Porcentagem
<i>papC</i>	7,00	18,42%	1,00	33,33%	0,00	0,00%	7,00	30,43%
<i>fimC</i>	37,00	97,37%	3,00	100,00%	2,00	100,00%	22,00	95,65%
<i>tsh</i>	9,00	23,68%	1,00	33,33%	2,00	100,00%	8,00	34,78%
<b>Toxinas</b>								
<i>vat</i>	16,00	42,11%	2,00	66,67%	0,00	0,00%	5,00	21,74%
<i>astA</i>	4,00	10,53%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	4,00	17,39%
<i>cvaA/B</i>	34,00	89,47%	3,00	100,00%	2,00	100,00%	11,00	47,83%
<b>Sistemas de aquisição de ferro</b>								
<i>iucD</i>	35,00	92,11%	3,00	100,00%	2,00	100,00%	12,00	52,17%
<i>Irp2</i>	15,00	39,47%	2,00	66,67%	0,00	0,00%	2,00	8,69%
<i>fyuA</i>	31,00	81,58%	2,00	66,67%	2,00	100,00%	5,00	21,74%
<i>chuA</i>	18,00	47,37%	2,00	66,67%	2,00	100,00%	5,00	21,74%
<b>Resistência sérica</b>								
<i>iss</i>	17,00	44,74%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	10,00	43,48%

## 4.4. Perfil genético das estirpes segundo

### Ewers

De acordo com os estudos desenvolvidos por Ewers, 2005 as estirpes de *E. coli* provenientes de aves são virulentas desde que tenham pelo menos quatro dos seguintes oito genes: *papC*, *tsh*, *iucD*, *irp2*, *iss*, *vat*, *astA* e *cvaA/B*.

Das 127 estirpes em estudo, 39 correspondem a esta definição sendo que 28 eram APEC e 11 AFEC. No Gráfico 3 está representada a distribuição das estirpes virulentas, segundo Ewers, 2005 nas APEC e nas AFEC.



**Gráfico 3:** Distribuição em percentagem das estirpes virulentas em APEC e em AFEC de acordo com a classificação de Ewers.

Dasquelas 39 estirpes o gene mais frequente foi o *iucD* (100,00%, 39/39). Nas APEC os genes *tsh*, *astA* e *iss* são mais frequentes e nas AFEC o gene *papC* está ausente (0,00%, 0/11). A Tabela 4 sumariza os resultados obtidos.

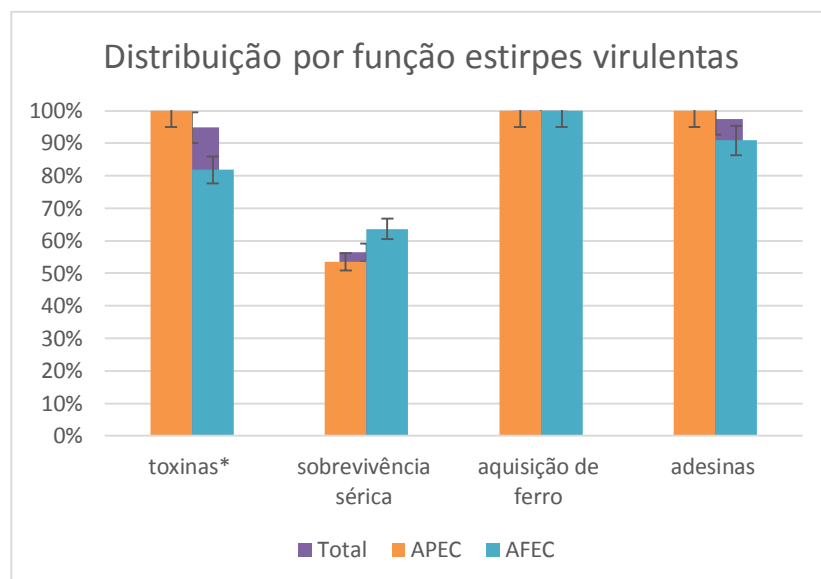
**Tabela 4:** Prevalência dos VAGs nas estirpes virulentas segundo Ewers, 2005.

	Estirpes em estudo (n =39)		APEC (n =28)		AFEC (n =11)		<i>p-value</i>
	Número de isolados	Percentagem	Número de isolados	Percentagem	Número de isolados	Percentagem	
<b>Adesinas</b>							
<i>papC</i>	7,00	17,95%	7,00	25,00%	0,00	0,00%	0,07
<i>fimC</i>	38,00	97,44%	28,00	100,00%	10,00	90,90%	0,11
<i>tsh</i>	21,00	53,85%	14,00	50,00%	7,00	63,64%	0,44
<b>Toxinas</b>							
<i>vat</i>	18,00	46,15%	15,00	53,57%	3,00	27,27%	0,14
<i>astA</i>	12,00	30,77%	6,00	21,43%	6,00	54,55%	0,04*
<i>cvaA/B</i>	33,00	84,62%	26,00	92,86%	7,00	63,64%	0,02*
<b>Sistemas de aquisição de ferro</b>							
<i>iucD</i>	39,00	100,00%	28,00	100,00%	11,00	100,00%	-
<i>irp2</i>	22,00	56,41%	17,00	60,71%	5,00	45,46%	0,39
<i>fyuA</i>	24,00	61,54%	21,00	75,00%	3,00	27,27%	0,01*
<i>chuA</i>	21,00	53,85%	15,00	53,57%	6,00	54,55%	0,96
<b>Resistência sérica</b>							
<i>iss</i>	22,00	56,41%	15,00	53,57%	7,00	63,64%	0,57

\* *p-value* ≤0,05 calculado pelo teste de *chi-square*, indica uma diferença significativa entre as APEC e as AFEC.



Agrupando os dados obtidos em função dos genes estudados, verificou-se que todas apresentam genes associados à aquisição de ferro (100,00%, 39/39). No gráfico 4 está representada a distribuição em função das estirpes virulentas APEC e AFEC.

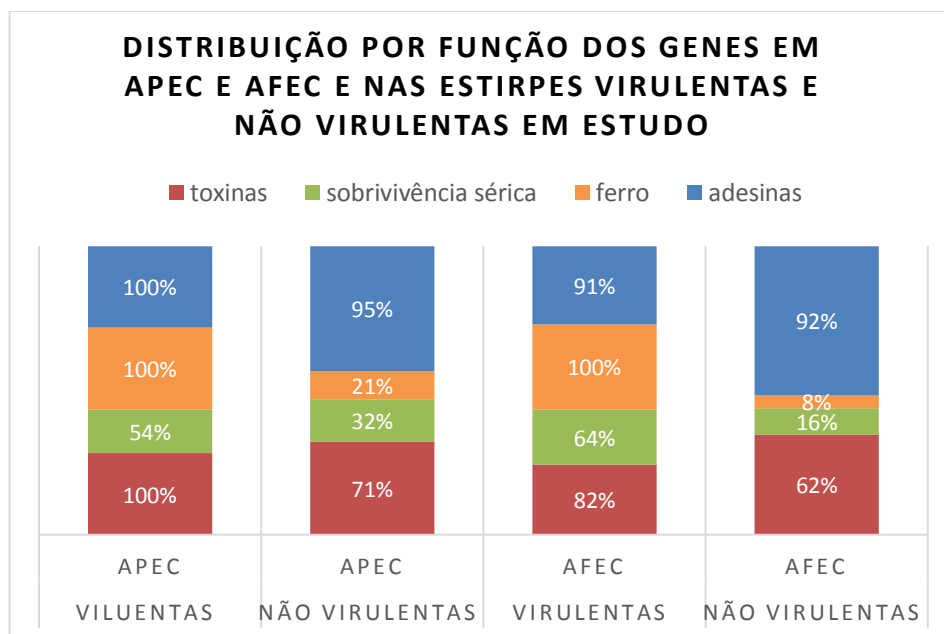


\*  $p$ -value  $\leq 0,05$  calculado pelo teste de *chi-square*, indica uma diferença significativa entre as APEC e as AFEC.

**Gráfico 4:** Distribuição por funções dos genes estudados nas estirpes virulentas de acordo com a definição de Ewers, 2005.

## 4.5. Comparação do perfil genético das APEC com as AFEC e com as estirpes virulentas e não virulentas de acordo com Ewers.

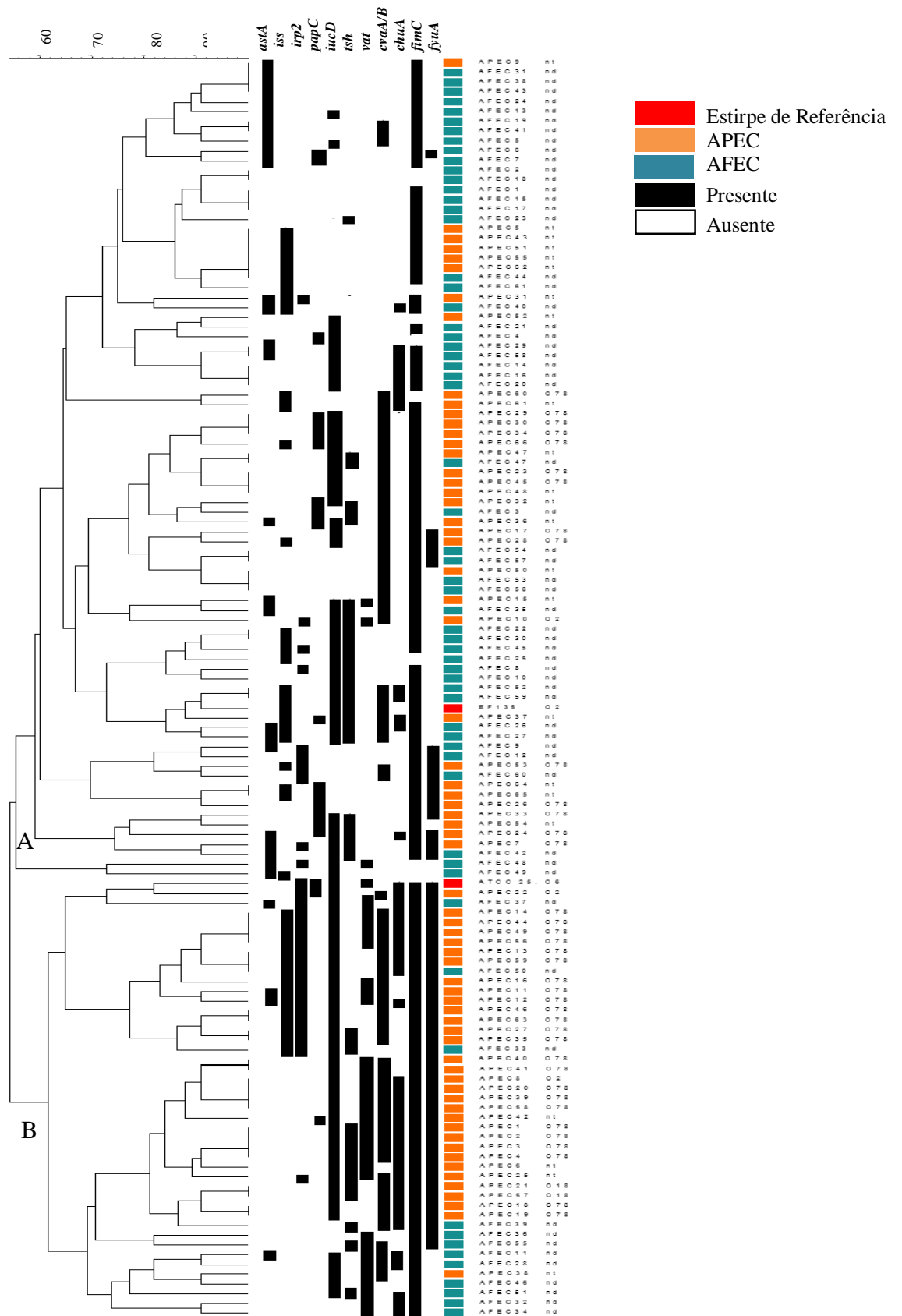
O gráfico 5 representa a comparação entre as APEC e as AFEC e as virulentas e não virulentas segundo a definição de Ewers, 2005 e de acordo com a função dos genes em estudo.



**Gráfico 5:** Comparação da distribuição das funções dos genes nas APEC e AFEC e nas estirpes virulentas e não virulentas.

## 4.6. Análise de agrupamento entre estirpes APEC e AFEC

A análise do dendrograma mostrou a grande variabilidade nas APEC e nas AFEC. As estirpes foram agrupadas em dois grupos. O *cluster* A continha majoritariamente as estirpes AFEC e a estirpe de referência EF135. O *cluster* B agrupava predominantemente as estirpes APEC e a estirpe de referência ATCC 25922. Verifica-se, pelo dendrograma da figura 8, que as APEC possuem mais genes que as AFEC, sobretudo: *fyuA*, *chuA*, *cvaA/B*, *vat*, *iucD* e *irp2*.



**Figura 8:** O Dendrograma mostra a relação entre as APEC e AFEC com base na análise UPGMA. Os genes apresentam-se pela seguinte ordem *astA*, *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *vat*, *cvaA/B*, *chuA*, *fimC* e *fyuA*.

## 5. Discussão

Considerando-se que as APEC são detentoras de um perfil genético diferente das estirpes comensais isoladas de fezes, AFEC, neste estudo determinou-se a prevalência de alguns dos genes responsáveis por fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de galinhas reprodutoras mortas por colibacilose e de cecos de frangos de carne abatidos em diferentes matadouros de diversas zonas de Portugal.

A serotipificação com os antígenos de superfície, devido às suas limitações, não pode ser usada como método de diagnóstico definitivo porque não reflete a virulência das estirpes. Contudo, em certas ocasiões, pode utilizar-se como um método rápido e simples para avaliação das APEC (Schouler, 2012). Os dados por nós obtidos (57,58% O78, 4,55% O2 e 3,03% O18) concordam com os descritos na literatura. De facto, McPeake, 2005 obtiveram 45,60% das estirpes O78 e 14,90% O2, e Schouler, 2012, embora com menor discrepância na frequência dos serogrupos, também verificaram que o mais prevalente era o O78 com 17,50% seguido de O2 com 17,30% e O18 com 9,00%. Contudo, estudos realizados por Ewers, 2004 mostraram que o serogrupo O2 era o mais frequente seguido do O78 com 28,70% e 14,70%, respetivamente.

O estudo do perfil dos genes de virulência pode, com maior fidelidade, ser utilizado como marcador na deteção e caracterização das APEC e, por conseguinte, no diagnóstico de colibacilose. Deste modo, a maioria das estirpes por nós estudadas (APEC e AFEC) apresentaram o gene *fimC* (92,91%) seguido dos genes *iucD* (65,35%), *cvaA/B* (55,12%), *fyuA* (41,73%), *chuA* (35,43%), *iss* (33,07%), *tsh* (30,70%), *vat* (25,98%), *astA* (23,62%), *irp2* (22,05%) e *papC* (14,96%). De acordo com a literatura as frequências daqueles genes são as seguintes, respetivamente: 90%-93%, 78%-100%, 62,7%, 58,2%-71,3%, 50,3%, 38,5%-100%, 39,5-93,9%, 33,4%-64,3%, 20%, 68,0%-100% e 22,7% (Delicato, 2003; Ewers, 2004; Ewers, 2005; Ewers, 2007; Johnson, 2008; Jeong, 2012).

Para compararmos os resultados obtidos nas estirpes isoladas de galinhas reprodutoras e de frangos de carne recorreremos ao teste *chi-square* para testar a hipótese nula da prevalência de igual número de genes nas duas populações estudadas. Encontrámos diferenças estatisticamente significativas entre as duas populações nos genes *astA*, *iss*, *papC*, *iucD*, *vat* e *fyuA*. Apesar da frequência do gene *fimC* ser a mais elevada, a diferença entre as estirpes APEC e AFEC não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). O gene menos frequente nas APEC é o *astA*, seguido do gene *papC*. A percentagem baixa de *papC* nas APEC deste estudo concorda com o descrito na literatura (Martinez, 2000;

Lymberopoulos, 2006; Lane, 2007). Nas estirpes AFEC os genes menos frequentes são o *papC* e o *irp2*.

Da análise destes genes podemos concluir que, à exceção do gene *astA*, todos os outros apresentam uma frequência mais elevada nas APEC. Este comportamento de *astA* vai de encontro ao descrito na literatura que refere a sua maior presença nas estirpes não patogénicas não estando bem esclarecido se o seu produto tem algum papel na patologia (Janben, 2001; McPeake, 2005; Jeong, 2012; Schouler, 2012; Kemmet, 2013). Com base nos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que a expressão do gene *astA* não tem qualquer papel na patogenicidade da colibacilose.

Neste estudo a caracterização de APEC e AFEC demonstrou uma elevada diversidade nas estirpes de *E. coli* isoladas. A ausência de um perfil característico das APEC é sugestiva da natureza oportunista destas bactérias.

Quando agrupámos as estirpes pelo serogrupo e analisámos a frequência dos genes verificou-se que em todos os serogrupos testados o gene *fimC* é predominante. Estes dados coincidem com os resultados obtidos nos trabalhos desenvolvidos por Ewers, 2004 e é indicativo da irrelevância da serotipificação no estudo das APEC.

Não há, de facto, um consenso na literatura em relação a quais os genes que seriam os marcadores de virulência ideais. Diferentes autores propõem métodos com base na existência de alguns genes de virulência. Ewers, 2005 consideram que as estirpes de *E. coli* provenientes de aves são virulentas desde que tenham pelo menos quatro dos seguintes genes: *papC*, *tsh*, *iucD*, *irp2*, *iss*, *vat*, *astA* e *cvaA/B*. Nas estirpes em estudo (APEC e AFEC), 30,70% incluem-se nesta definição. Pelo teste de *chi-square*, existem diferenças estatisticamente significativas nas duas populações para os genes *astA*, *cvaA/B* e *fyuA* com os valores de *p-value* inferiores a 0,05 entre as duas populações. O gene *iucD* apresentou uma prevalência de 100,00% quer nas APEC virulentas ( $n=28$ ) quer nas AFEC virulentas ( $n=11$ ) e o gene *fimC*, com 100,00% nas estirpes APEC virulentas e 90,91% nas AFEC virulentas. Avaliando os genes pela função que desempenham e pelo seu contributo para a sobrevivência no organismo do hospedeiro verificamos uma elevada diferença nos genes associados à aquisição de ferro entre os dois grupos, APEC e AFEC.

O ferro na sua forma livre existe em muito baixas concentrações nos tecidos do hospedeiro devido a proteínas como a transferrina que o capturam, contudo este elemento é crucial para a sobrevivência bacteriana. As *E. coli* desenvolveram mecanismos para adquirirem ferro de ambientes em que a sua quantidade é limitada. Desta forma as bactérias com sistemas de aquisição de ferro, tais como o *irp2*, *iucD*, *chuA* e *fyuA*, entre outros, são

as mais capacitadas para sobreviverem e se desenvolverem no organismo do animal, e, em caso oportuno, provocar doença com a consequente morte do animal. Facto, confirmado por alguns autores, que, em modelos animais, demonstraram que os genes envolvidos na aquisição de ferro apresentavam maior expressão (Li, 2011; Tuntufye, 2012). Para além de contribuírem para o aumento das quantidades de ferro bacteriano adquirido, desempenham um papel relacionado com a sobrevivência ao Sistema Imunitário Inato e nutricional do hospedeiro. Os sistemas de aquisição de ferro são os fatores de imunidade nutricional melhor estudados (Huja, 2014). Durante o processo de infeção as células polimorfonucleares do Sistema Imunitário do hospedeiro produzem lactoferrina, que reduz as quantidades de ferro disponíveis, impossibilitando o seu acesso às bactérias (Cassat e Skaar 2013). A isto, denomina-se Sistema Imunitário nutricional, que se caracteriza por privar o invasor de nutrientes essenciais à sua sobrevivência (Huja, 2015).

A lactoferrina ligada ao ferro é libertada nos vacúolos fagocitários daqueles polimorfonucleares, onde o ferro funciona como catalisador na produção de radicais hidroxilo ( $\text{NOH}$ ) a partir do peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e do anião superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) pela reação de Haber-Weiss. Os radicais hidroxilo são os mais reativos e potentes oxidantes das *Reactive Oxygen Species* (ROS) produzidas pelas células fagocitárias e uteis no combate a invasores. O papel dos sistemas de aquisição de ferro, tais como yersiniabactina (*irp2*), consiste na captura do ferro, não permitindo que ele se ligue à lactoferrina e inibindo a produção de ROS mediados por esta proteína (Paauw, 2009; Tuntufye, 2012).

A maioria das APEC em estudo possuía três ou mais genes associados à aquisição de ferro, ao contrário das AFEC que apenas apresentaram um ou dois genes. A posse de mais do que um sistema de transporte de ferro pode refletir os diversos ambientes onde habitam e representar uma evolução adaptativa das bactérias. Diferentes sistemas de aquisição de ferro podem ser expressos em diferentes momentos e em diferentes locais durante o processo infeccioso (Janben, 2001).

Considerando ainda os sistemas de aquisição de ferro, nas APEC verificou-se um perfil maioritário (36,36%) da associação entre três genes *iucD*, *chuA* e *fyuA*, perfil este que não foi encontrado em nenhuma AFEC. Também detetámos maioritariamente a combinação dos genes *fyuA*, *irp2* e *iucD* (24,24%) nas estirpes APEC, tal como nos estudos desenvolvidos por Janssen, 2001. Este facto é indicativo da importância dos sistemas de aquisição de ferro na patogenicidade das APEC. Também nestas estirpes outras associações entre genes podem ser importantes na virulência nomeadamente a associação *iucD* e *tsh* (Janben, 2001; Delicato, 2003). Segundo Janssen, 2001, 79,3% das estirpes

estudadas detinham a combinação de genes de aquisição de ferro e adesinas, *iucD*, *tsh* e *fimC*. Nos nossos dados esta combinação aparece em 14,96% do total das estirpes sendo mais frequente nas APEC com 24,24%. O facto de no nosso estudo não se verificarem diferenças estatisticamente significativas no gene *tsh*, entre APEC e AFEC, comprova que, isoladamente, este gene, por si só, não é virulento mas que associado a outros, sobretudo de aquisição de ferro, pode aumentar a virulência das estirpes.

A função dos genes de virulência testados neste estudo está bem definida na literatura e a sua presença pode indicar um potencial fator de risco para uma infeção mediada por APEC. Desta forma, a monotorização e comparação do perfil dos genes de virulência na indústria aviária, num determinado período de tempo, pode contribuir para a compreensão do comportamento destes genes.

Diversos autores, tem descrito que as APEC e AFEC colonizam persistentemente o aparelho gastrointestinal com translocação extraintestinal, aquando da presença de fatores de *stress*. Os nossos dados confirmam que os diferentes genes de virulência estão presentes quer nas APEC quer nas AFEC, demonstrando a natureza oportunista destas bactérias.

Deste trabalho também se conclui que a virulência não está associada a um único gene, mas sim a uma combinação de genes. Estes dados podem ser utilizados para o desenvolvimento de uma vacina eficaz e apta para solucionar as perdas económicas na indústria aviária.

Em conclusão, e de acordo com a literatura, não há consenso em relação aos genes de virulência, que seriam os marcadores ideais para o diagnóstico de APEC. Mais estudos serão necessários para identificar os fatores de virulência que permitam distinguir APEC de AFEC.

## 6. Conclusões e perspectivas futuras

A proteção dos animais nas explorações é um tema com legislação própria atribuída e de interesse nacional e comunitário, no que diz respeito às condições de criação e manutenção. O cumprimento das normas estabelecidas tem importância para a salvaguarda da saúde dos animais e para a garantia da qualidade e da segurança alimentar.

O Decreto-Lei nº 72-F/2003 de 14 de abril<sup>1</sup> estabelece as regras para criação de galinhas poedeiras, bem como os parâmetros que devem ser observados nesta produção, de modo a melhorar as condições do bem-estar do animal, do ponto de vista sanitário, económico e social, mas também no que diz respeito às implicações ambientais. Nesta legislação é ainda assegurado o registo das explorações, de forma a permitir a rastreabilidade dos ovos colocados no mercado para consumo humano.

As boas práticas de higiene e as condições das instalações dos animais, quando bem executadas, ajudam no controlo das epidemias e evitam problemas relacionados com as APEC.

A biossegurança das explorações aviárias é também importante, pois permite controlar as vias de entrada dos agentes infecciosos, quer através de pessoas (fornecedores e trabalhadores), veículos, aves do dia, outros animais (insetos, aves e roedores), água de abastecimento ou alimentos, quer através de outros vetores. No entanto, e apesar do cumprimento das normas, a ocorrência de infeções é um facto.

A produção e a utilização de vacinas eficazes leva à redução das patologias e, consequentemente, à diminuição da administração de antimicrobianos nas explorações aviárias. A baixa do nível da mortalidade e da morbilidade dos indivíduos diminui, assim, os custos de produção. A prevenção de doenças, através do recurso à vacinação, é parte integrante dos protocolos de manejo dos animais. Rotineiramente são usadas vacinas em galinhas nas quais se incluem: *Marek's disease virus* (MDV), *Newcastle disease virus* (NDV), *Infectious Bronchitis Virus* (IBV) e *Infectious Bursal Disease Virus* (IBDV). A administração destas vacinas pode ser: *in ovo*, colírio ou injeção na asa, aerossol ou *spray* no ambiente e através da água de bebida (Schultz, 1999).

---

<sup>1</sup> O Decreto Legislativo Regional n.º 6/2012/M, de 19 de abril procede à adaptação à Região Autónoma da Madeira do Decreto-Lei n.º 72-F/2003. Decreto-Lei n.º 72-F/2003, de 14 de abril, que transpõe para a ordem jurídica nacional a Diretiva n.º 1999/74/CE, do Conselho, de 19 de julho, relativa à proteção das galinhas poedeiras, e a Diretiva n.º 2002/4/CE, da Comissão, de 30 de janeiro, relativa ao registo de estabelecimentos de criação de galinhas poedeiras.



A vacinação é um dos métodos que tem sido aplicado no controlo da colibacilose. As vacinas produzidas têm sido, tanto vivas como inativadas, de subunidades ou recombinantes (Salehi, 2012). Cada tipo tem benefícios e limitações, e são usadas de acordo com o contexto da indústria aviária e com o microrganismo envolvido. Uma escolha inadequada da vacina pode comprometer a proteção contra a bactéria em causa.

As vacinas vivas são consideradas as mais apropriadas para a imunização contra a *E. coli*, pelo facto de permitirem a vacinação em massa, através da água ou de aerossóis (Salehi, 2012).

A investigação para o desenvolvimento de vacinas está em constante evolução, sobretudo com o aparecimento das tecnologias de biologia molecular que permitiram o aparecimento de vacinas recombinantes. A manipulação do genoma das estirpes com os genes de interesse, que codificam proteínas de membrana permite a criação de “vacinas não-patogénicas” e capazes de induzir uma resposta imunitária protetora e duradoura, com uma única imunização, uma vez que as estirpes se replicam no organismo. Uma outra vantagem deste tipo de vacinação é o facto de se poder imunizar o animal para mais do que um gene de virulência, que pode ser introduzido no genoma bacteriano por recombinação genética. Contudo, o desenvolvimento deste tipo de vacinação torna-se dispendioso no seu desenvolvimento (Schultz, 1999).

Um método de profilaxia eficaz poderá basear-se numa vacina de rebanho com as estirpes que “circulam” no bando. Estas são vacinas inativadas, conferem proteção específica para os antígenos predominantes no bando e atuam principalmente através da indução da resposta imunitária humoral, duradoura.

Em conclusão, e do nosso estudo, uma vacina de rebanho com as estirpes de *E. coli* com os antígenos *fimC*, *iss*, *iucD*, *fyuA*, *irp2*, *chuA*, *cvaA/B* e *vat* diminuiria seguramente a mortalidade nos bandos.

## 7. Referências bibliográficas

- Abdi-Hachesoo, B., Asasi, K. e Sharifiyazdi, H. (2013). Rapid detection of *Escherichia coli gyrA* and *parC* mutants in one-day-old broiler chicks in Iran. *Veterinaria Italiana.*, 49 (3), 291-297.
- Agunos, A., Léger, D. e Carson, C. (2012). Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. *Canadian Veterinary.*, 53, 1289-1300.
- Baptista, A., Kobayashi, R., Venâncio, E. e Vidotto, M. (2010). Cloning, expression and sequence diversity of *iss* gene from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated in Brazil. *Ciências Agrárias Londrina.*, 31 (3), 723-732.
- Babai, R., Stern, B., Hacker, J. e Ron, E. (2000). New Fimbrial Gene Cluster of S-Fimbrial Adhesin Family. *Infection and Immunity.*, 68(10), 5901–5907.
- Benite, A. e Machado, S. (2002). Sideróforos: “ Uma resposta dos microorganismos”. *Química Nova.*, 25(6B), 1155-1164.
- Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J. e Denamur, E. (1998). Phylogenetic Analysis of *Escherichia coli* Strains Causing Neonatal Meningitis Suggests Horizontal Gene Transfer from a Predominant Pool of Highly Virulent B2 Group Strains. *The Journal of Infectious Diseases.*, 177, 642–50.
- Blyn, L., Braaten, B. e Low, D. (1990). Regulation of *pap* pilin phase variation by a mechanism involving differential Dam methylation states. *The EMBO Journal.*, 9 (12), 4045-4054.
- Bryan, A., Roesch, P., Davis, L., Moritz, R., Pellett, S. e Welch, R. (2006). Regulation of Type 1 Fimbriae by Unlinked FimB- and FimE-Like Recombinases in Uropathogenic *Escherichia coli* Strain CFT073. *Infection and Immunity.*, 74 (2), 1072–1083.
- Campos, T., Stehling, S., Ferreira, A., Castro, A., Brocchi, M. e Silveira, W. (2005). Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of Avian *Escherichia coli* strains. *Veterinary Microbiology.*, 106, 275-285.
- Cassat, J. e Skaar, E. (2013). Iron in Infection and Immunity. *Cell Host Microbe.*, 13 (5), 509–519.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. e Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology.*, 66 (10), 4555-4558.

- Cunha, M. (2014). Resistência aos antimicrobianos e virulência das *Escherichia coli* patogênicas para Aves (APEC) isoladas de perus com doença respiratória. São Paulo: Dissertação (Mestrado) -Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia.
- Delicato, E., Brito, B., Gaziri, L. e Vidotto, M. (2003). Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology.*, 94, 97–103.
- Dozois, C., Daigle, F. e Roy, C. (2003). Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an *avian pathogenic Escherichia coli* strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 100 (1), 247–252.
- Dziva, F. e Stevens, M. (2008). Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology.*, 37(4), 355-366.
- Ewers, C., Janssen, T. e Wieler, L. (2003). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.*, 116(9-10), 381-95.
- Ewers, C., Janben, T., Kiebling, S., Philipp, H. e Wieler, L. (2005). Rapid detection of Virulence-associated genes in *Avian Pathogenic Escherichia coli* by Multiplex Polimerase Chain Reaction. *Avian Diseases.*, 49, 269-273.
- Ewers, C., Janbenb, T., Kieblinga, S., Philipp, H. e Wieler, L. (2004). Molecular epidemiology of *avian pathogenic Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology.*, 104, 91-101.
- Ewers, C., Li, G., WilKing, H., Kieblinga, S., Alta, K., Antáo, E., Laturusa, C., Diehla, I., Gloddea, S., Homeiera, T., Böhnkea, U., Steinrückb, H., Philippc, H. e Wieler, L. (2007). Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they?. *Journal of Medical Microbiology.*, 297, 163–176.
- Frömmel, U., Lehmann, W., Rödiger, S., Böhm, A., Nitschke, J., Weinreich, J., Groß, J., Roggenbuck, D., Zinke, O., Ansorge, H., Vogel, S., Klemm, P., Wex, T., Schröder, C., Wieler, L. e Schieracka, P. (2013). Adhesion of Human and Animal *Escherichia coli* Strains in Association with Their Virulence-Associated Genes and Phylogenetic Origins. *Applied and Environmental Microbiology.*, 79(19), 5814–5829.
- Gal-Mor, O. e Finlay, B. (2006). Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular Microbiology.*, 8(11), 1707–1719.

- Gao, Q., Wang, X., Xu, H., Xu, Y., Ling, J., Zhang, D., Gao, S. e Liu, X. (2012). Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection Model. *BMC Microbiology.*, 12(143), 1-12.
- Garcia, E., Brumbaugh, A. e Mobley, H. (2011). Redundancy and Specificity of *Escherichia coli* Iron Acquisition Systems during Urinary Tract Infection. *Infection and Immunity.*, 79 (3), 1225–1235.
- Ghunaim, H., Abdu-Madi, M. e Kariyawasam, S. (2014). Advances in Vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli* respiratory disease: Potentials and limitations. *Veterinary Microbiology.*, 172, 13-22.
- Graveline, R., Garneau, P., Martin, C., Mourez, M., Hancock, M., Lavoie, R. e Harel, J., (2014). Leucine-Responsive Regulatory Protein Lrp and PapI Homologues Influence Phase Variation of CS31A Fimbriae. *Journal of Bacteriology.*, 196 (16), 2944–2953.
- Guilvout, I., Carniel, E. e Pugsley, A. (1995). *Yersinia* spp. HMWP2, a Cytosolic Protein with a Cryptic Internal Signal Sequence Which Can Promote Alkaline Phosphatase Export. *Journal of Bacteriology.*, 177 (7), 1780–1787.
- Guo, X., Harrison, R. e Tai, P. (2006). Nucleotide-Dependent Dimerization of the C-Terminal Domain of the ABC Transporter CvaB in Colicin V Secretion. *Journal of Bacteriology.*, 188 (7), 2383–2391.
- Hagan, E. e Mobley, H. (2009). Heme acquisition is facilitated by a novel receptor Hma and required by uropathogenic *Escherichia coli* for kidney infection. *Molecular Microbiology.*, 71 (1), 79–91.
- Hancock, V., Ferrières, L. e Klemm, P. (2008). The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infection *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology.*, 154, 167-175.
- Housden, N. e Kleantous, C. (2012). Colicin translocation across the *Escherichia coli* outer membrane. *Biochemical Society Transaction.*, 40, 1475–1479.
- Huja, S., Oren, Y., Biran, D., Meyer, S., Dobrindt, U., Bernhard, J., Becher, D., Hecker, M., Sorek, R. e Rona, E. (2014). Fur Is the Master Regulator of the Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Response to Serum. *mBio.*, 5 (4).
- Huja, S., Oren, Y., Trost, E., Brzuszkiewicz, E., Biran, D., Blom, J., Goesmann, A., Gottschalk, G., Hacker, J., Ron, E. e Dobrindt, U. (2015). Genomic Avenue to Avian Colisepticemia. *mBio.*, 6 (1), 1-13.

- Hwang, J., Zhong, X. e Tai, P. (1997). Interactions of Dedicated Export Membrane Proteins of the Colicin V Secretion System: CvaA, a Member of the Membrane Fusion Protein Family, Interacts with CvaB and TolC. *Journal of Bacteriology.*, 179 (20), 6264–6270.
- Janben, T., Schwar, C., Preikschat, P., Voss, M., Philipp, H. e Wieler, H. (2001). Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal Medicine. Microbiology.*, 291, 371-378.
- Jeong, Y., Kim, T., Kim, J. e Kwon, J. (2012). Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. *Joournal of Veterinary Science.*, 13(2)., 145-152.
- Johnson, J. (1991). Virulence Factors in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. *Clinical Microbiology Reviews.*, 4(1), 80-128.
- Johnson, T., Wannemuehler, Y., Johnson, S., Stell, A., Doetkott, C., Johnson, J., Kim, K., Spanjaard, L. e Nolan, L. (2008). Comparison of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains from Human and Avian Sources Reveals a Mixed Subset Representing Potential Zoonotic Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology.*, 74 (22), 7043–7050.
- Johnson, T., Giddings, C., Horne, S., Gibbs, P., Wooley, R., Skyberg, J., Olah, P., Kercher, R., Sherwood, J., Foley, S. e Nolan, L. (2002). Location of Increased Serum Survival Gene and Selected Virulence Traits on a Conjugative R Plasmid in an Avian *Escherichia coli* Isolate. *Avian Diseases.*, 46, 342–352.
- Johnson, T., Wannemuehler, Y. e Nolan, L. (2008). Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology.*, 74 (8), 2360–2369.
- Kemmet, K., Humphrey, T. Rushton, S., Close, A., Wigley, P. e Williams, N. (2013). A Longitudinal Study Simultaneously Exploring the Carriage of APEC Virulence Associated Genes and the Molecular Epidemiology of Faecal and Systemic *E.coli* in Commercial Broiler Chickens. *Plos One.*, 8:6.
- Kobayashi, R., Gaziri, L. e Vidotto, L. (2010). Functional activities of the Tsh protein from *avian pathogenic Escherichia coli* (APEC) strains. *Journal Veterinary Science.*, 11(4), 315-319.
- Kouse, A., Righetti, F., Kortmann, J., Narberhaus, F. e Murphy, E. (2013). RNA-Mediated Thermoregulation of Iron-Acquisition Genes in *Shigella dysenteriae* and Pathogenic *Escherichia coli*. *PlosOne.*, 8(5).

- Kostakioti, M. e Stathopoulos, C. (2004). Functional Analysis of the Tsh Autotransporter from an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain. *Infection and Immunity.*, 72 (10), 5548–5554.
- Kwaga, J., Allan, B., Hurk, J. Seida, H. e Potter, A. (1994). A *carAB* Mutant of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Serogroup O2 Is Attenuated and Effective as a Live Oral Vaccine against Colibacillosis in Turkeys. *Infection and Immunity.*, 62 (9), 3766-3772.
- Lane, MC. e Mobley, HLT. (2007). Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *International Society of Nephrology.*, 72, 19–25.
- Leyton, D., Sevastyanovich, Y., Browning, D., Rossiter, A., Wells, T., Fitzpatrick, R., Overduin, M., Cunningham, A. e Henderson, I. (2011). Size and Conformation Limits to Secretion of Disulfide-bonded Loops in Autotransporter Proteins. *Journal Biology Chemistry.*, 286(49), 42283–42291.
- Li, G., Tivendale, K., Liu, P., Feng, Y., Wannemuehler, Y., Cai, W., Mangiamele, P., Johnson, T., Constantinidou, C., Penn, C. e Nolan, L. (2011). Transcriptome Analysis of Avian Pathogenic *Escherichia coli* O1 in Chicken Serum Reveals Adaptive Responses to Systemic Infection. *Infection and Immunity.*, 79 (5), 1951–1960.
- Ling, J., Pan, H., Gao, Q., Xiong, L., Zhou, Y., Zhang, D., Gao, S. e Liu, X. (2013). Aerobactin Synthesis Genes *iucA* and *iucC* Contribute to the Pathogenicity of Avian Pathogenic *Escherichia coli* O2 Strain E058. *PLoS One.*, 8 (2).
- Lymberopoulos, M., Houle, S., Daigle, F., Léveillé, S., Brée, A., Moulin-Schouleur, M., Johnson, J. e Dozois, C. (2006). Characterization of Stg Fimbriae from an Avian Pathogenic *Escherichia coli* O78:K80 Strain and Assessment of Their Contribution to Colonization of chicken respiratory tract. *Journal of Bacteriology.*, 188(18), 6449-6459.
- Lynne, A., Skyberg, J., Logue, C. e Nolan, L. (2007). Detection of Iss and Bor on the surface of *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology.*, 102, 660–666.
- Lynne, A., Foley, S. e Nolan, L. (2006). Immune Response to Recombinant *Escherichia coli* Iss Protein in Poultry. *Avian Diseases.*, 50, 273–276.
- Martinez, J., Mulvey, M., Schilling, J., Pinkner, J. e Hultgren, S. (2000). Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO Journal.*, 19 (2), 2803-2812.

- McPeake, S., Smyth, J. e Baal, H. (2005). Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Veterinary Microbiology.*, 110, 245-253.
- McWilliams, B. e Torres, A. (2014). EHEC Adhesins. *Microbiol Spectr.* Author manuscript., 2 (2).
- Miethke, M. e Marahiel, M. (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 71 (3), 413–451.
- Moriel, D., Bertoldi, I., Spagnuolo, A., Marchi, S., Rosini, R., Nesta, B., Pastorello, I., Corea, V., Torricelli, G., Cartocci, E., Savino, S., Scarselli, M., Dobrindt, U., Hacker, J., Tettelin, H., Tallon, L., Sullivan, S., Wieler, L., Ewers, C., Pickard, D., Dougan, G., Fontasna, M., Rappuoli, R., Pizza, M. e Serino, L. (2010). Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 107:20, 9072-9077.
- Mortezaei, N., Singh, B. Bullitt, E, Uhlin, B. e Andersson, M. (2013). P-fimbriae in the presence of anti-PapA antibodies: new insight of antibodies action against pathogens. *Scientific Reports.*
- Nagy, G., Dobrindt, U., Kupfer, M., Emödy, L., Kareh, H. e Hacker, J. (2001). Expression of Hemin Receptor Molecule ChuA Is Influenced by RfaH in Uropathogenic *Escherichia coli* Strain 536. *Infection and Immunity.*, 69 (3), 1924–1928.
- Oh, K., Kim, D., Jung, S. e Cho, S. (2014). Molecular Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrheal Patients in Korea during 2003–2011. *Plos One.*, 9 (5).
- Paauw, A., Hall, M., Kessel, K., Verhoef, J. e Fluit, A. (2009). Yersiniabactin Reduces the Respiratory Oxidative Stress Response of Innate Immune Cells. *Plos ONE.*, 4 (12).
- Parham, N., Pollard, S., Desvaux, M., Scott-Tucker, A., Liu, C., Fivian, A. e Henderson, I. (2005). Distribution of the Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae among Extraintestinal Clinical Isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology.*, 43 (8), 4076–4082.
- Parreira, V. e Gyles, C. (2003). A Novel Pathogenicity Island Integrated Adjacent to the *thrW* tRNA Gene of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Encodes a Vacuolating Autotransporter Toxin. *Infection And Immunity.*, 71(9), 5087-5096.
- Porcheron, G., Garénaux, A., Proulx, J., Sabri, M. e Dozois, C. (2013). Iron , copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations

- between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Cellular and Infection Microbiology.*, 3(90).
- Pusz, P., Bok, E., Mazurek, J., Stosik, M. e Baldy-Chudzik, K. (2014). Type 1 fimbriae in commensal *Escherichia coli* derived from healthy huma. *Acta Biochimica Polonica.*, 61 (2), 389–392.
- Ritter, A., Gally, D., Olsen, P., Dobrindt, U., Friedrich, A., Klemm, P. e Hacker, J. (1997). The PAI associated leux specific tRNA<sup>5</sup><sub>Leu</sub> affects type 1 fimbriation in pathogenic *Escherichia coli* by control of FimB recobinase expression. *Molecular Microbiology.*, 25 (5), 871-882.
- Roman-Hernandez, G., Peterson, J. e Bernstein, H. (2014). Reconstitution of bacterial autotransporter assembly using purified components. *eLife.*, 3, 1-20.
- Salehi, T., Tabatabaei, S., Karimi, V., Fasaee, B., Derakhshandeh, A. e Jahromi, O. (2012). Asseement of immunity against avian colibacillosis induced by an *aroA* mutany containing increased serum survival gene in broilers. *Brazilian Journal of Microbiology.*, 363-370.
- Savarino, S., Fasano, A., Watson, J., Martin, B., Levine, M., Guandalini, S. e Guerry, P. (1993). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E.coli* heat-stable toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 90, 3093-3097.
- Schouler, C., Schaeffer, B., Brée, A., Mora, A., Dahbi, G., Biet, F., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, J. e Moulin-Schoule, M. (2012). Diagnóstico strategy for identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *Journal of clinical Microbbiology.*, 50 (5), 1673-1678.
- Schultz, R. (199). *Veterinary Vaccines and Diagnostics*. San Diego : Academic Press., 41, 481-490.
- Shubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E. e Heesemann, J. (1998). Prevalence of the "High-Pathogenicity Island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infection and Immunity.*, 66(2), 480-485.
- Snyder, J., Haugen, B., Lockatell, C., Maroncle, N., Hagan, E., Johnson, D., Welch, R. e Mobley, H. (2005). Coordinate Expression of Fimbriae in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity.*, 73 (11), 7588–7596.
- Spurbeck, R., Dinh, P., Walk, S., Stapleton, A., Hooton, T., Nolan, L., Kim, K., Johnson, J. e Mobleya, H. (2012). *Escherichia coli* Isolates That Carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and



- yfcV* Efficiently Colonize the Urinary Tract. *Infection and Immunity.*, 80 (12), 4115–4122.
- Stathopoulos, C., Provence, D. e Curtiss, R. (199). Characterization of the Avian Pathogenic *Escherichia coli* Hemagglutinin Tsh, a Member of the Immunoglobulin A Protease-Type Family of Autotransporters. *Infection and Immunity.*, 67 (2). 772–781.
- Suits, M., Lang, J., Pal, G., Couture, M. e Jia, Z.(2009). Structure and heme binding properties of *Escherichia coli* O157:H7 ChuX. *Protein Science.*, 18, 825-838.
- Szemiako, K., Krawczyk, B., Samet, A., Sledzińska, A., Nowicki, B., Nowicki, S. e Kur, J. (2013). A subset of two adherence systems, acute pro-inflammatory *pap* genes and invasion coding *dra*, *fim*, or *sfa*, increases the risk of *Escherichia coli* translocation to the bloodstream. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.*, 32, 1579-1582.
- Thattai, M. e van Oudenaarden, A. (2004). Stochastic Gene Expression in Fluctuating Environments. *Genetics Society of America.*, 167, 523–530.
- Tiariath, A., Socha, D., Valvano, M. e Viswanatha, T. (1993). Construction and Biochemical Characterization of Recombinant Cytoplasmic Forms of the IucD Protein (Lysine:N6-Hydroxylase) Encoded by the pColV-K30 Aerobactin Gene Clustert. *Journal of Bacteriology.*, 175 (3), 589-596.
- Tivendale, K., Allen, J., Ginns, C., Crabb, B. e Browning, G. (2004). Association of *iss* and *iucA*, but Not *tsh*, with Plasmid-Mediated Virulence of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Infection And Immunity.*, 72 (11), 6554–6560.
- Troxell, B. e Hassan, H. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.*, 59(3).
- Tuntufye, H., Lebeer, S., Gwakisa, P. e Goddeeris, B. (2012). Identification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* genes that are induced in vivo during infection in chickens. *Applied and Environmental Microbiology.*, 3343-3351.
- Wiles, T., Kulesus, R. e Mulvey, M. (2008). Origins and virulence Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology.*, 85(1), 11-19.
- Xu, J., Cheng, B., Wen, X., Cui, S. e Ye, C. (200). High-Pathogenicity Island of *Yersinia* spp. in *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhea Patients in China. *Journal of Clinical Microbiology.*, 38 (12), 4672–4675.

Zhao, L., Gao, S., Huan, H., Xu, X., Zhu, X., Yang, W., Gao, Q., Liu, X. (2009). Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E.coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiology.*, 155, 1634-1644.

## Anexos

- A. Procedimentos para a serotipagem
- B. Procedimentos para a extração de DNA de *Escherichia coli*
  - a. Extração simples
  - b. Controlo quantitativo e qualitativo do DNA
- C. Verificação da integridade do DNA através de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v)
- C. Amplificação do DNA por PCR-Multiplex
- D. Separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 2% (m/v)

# Anexo A

## Procedimentos para a serotipificação

A serotipagem é efetuada por aglutinação rápida em placa. O princípio do método baseia-se numa reação antigénio-anticorpo. Se as *E. coli* em estudo possuírem os antigénios testados na superfície membranares estes ligam-se ao anticorpo específico. A reação antigénio-anticorpo resulta numa clara e visível aglutinação das estirpes.

- Material e reagentes:
  - Colonias de *E. coli* semeadas em placas de *Trypticase Soja Agar* (Oxoid, Reino Unido) e incubadas em aerobiose a 37 °C *overnight*;
  - Antissoros comerciais O2, O18 e O78 (Sinfim, Alemanha);
  - Água destilada;
  - Solução de Cloreto de Sódio 0,9%;
  - Placas escuras para aglutinação (Sinfim, Alemanha);
  - Anças descartáveis (Sarstedt, Alemanha).
- Procedimento experimental:
  - Os reagentes contendo os anticorpos O2, O18 e O78 mantinham-se liofilizados. A sua hidratação é efetuada adicionando-se 1 mL de água destilada e guardam-se a 4 °C até à sua utilização;
  - Os testes de aglutinação são realizados sobre uma placa de aglutinação escura;
  - Na placa de aglutinação a cada gota de antissoro adiciona-se uma colónia isolada de *E. coli*;
  - Mistura-se a colónia e a gota de soro respetivo;
  - Agita-se a placa de aglutinação durante uns minutos;
  - Considera-se positivo os resultados onde ocorre aglutinação e negativo quando não ocorre;
  - Proceda-se de igual modo, para controlo de falsos positivos, substituindo os anticorpos por uma solução de Cloreto de Sódio (0,9%);

## Anexo B

O manuseamento de produtos biológicos e químicos é efetuado em condições de esterilidade e de acordo com as normas de segurança. A descontaminação do material e o acondicionamento de resíduos realiza-se segundo as indicações do Manual de Segurança.

### Procedimentos para a extração de DNA de *Escherichia coli*

Todos os procedimentos que envolvem DNA realizam-se na câmara de fluxo laminar em sala própria para o efeito, independente da manipulação dos reagentes de PCR.

Na extração de DNA simples, obtém-se DNA não purificado, que resulta unicamente da lise celular por incubação das suspensões a 100°C, seguida da recolha do sobrenadante contendo, entre outros, o DNA.

#### a. Extração simples

- Material e reagentes:
  - Colonias de *E. coli* semeadas em placas de *Trypticase Soja Agar* (Oxoid, Reino Unido) e incubadas em aerobiose a 37 °C *overnight*;
  - Água destilada;
  - Microtubos de 0,5 mL (eppendorf, Alemanha);
  - Micropipetas de 200 µL (BioHit, Alemanha);
  - Pontas de micropipetas com filtro (BioHit, Alemanha);
  - Banho-Maria a 100 °C (Mettler, Alemanha);
  - Centrífuga de microtubos (Minispin eppendorf, Alemanha);
  - Câmara de fluxo laminar de segurança biológica classe II (Astec Microflow advanced biosafety cabinet, Reino Unido);
  - Vortex (Labinco L46, Holanda);
  - Anças descartáveis (Sarstedt, Alemanha).
- Procedimento experimental:

- Retira-se uma colônia isolada e resuspende-se em 200  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril;
- A suspensão bacteriana é sujeita a fervura em Banho-Maria a 100 °C durante 10 minutos após a qual é centrifugada a 9660 g (12 000 rpm) durante 30 segundos;
- O sobrenadante é guardado a 4 °C.

## b. Controlo quantitativo e qualitativo do DNA

- Material e reagentes:
  - Espectrofotómetro de absorção molecular com comprimento de onda de 260 nm (WPA, Biochrom, Alemanha);
  - *Cuvetts* descartáveis;
  - Micropipetas de 10  $\mu\text{L}$  e 1000  $\mu\text{L}$  (BioHit, Alemanha);
  - Pontas de micropipeta com filtro (BioHit, Alemanha);
  - Água destiladas;
  - DNA bacteriano resultante da extração simples.
- Procedimento experimental:
  - Efetua-se uma diluição (1:50) do DNA com água destilada. A 10  $\mu\text{L}$  de DNA adicionou-se 490  $\mu\text{L}$  de água destilada;
  - Lê-se a absorvância a 260 nm e determina-se a concentração do DNA em  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

## c. Verificação da integridade do DNA através de electroforese em gel de agarose a 1% (m/v)

- Material e reagentes:
  - Erlenmeyer de 500 mL (Marien Feld, Alemanha);
  - Balança de precisão (Precisa 4000C, Suíça);
  - Micro-ondas (Samsung, Coreia do sul);
  - Provetas de 1000 mL  $\pm$  10,00 mL (Simax, Republica Checa);
  - Micropipetas de 20  $\mu\text{L}$  (BioHit, Alemanha);

- Pontas de micropipeta (BioHit, Alemanha);
- Tina de electroforese (Compact L/XL biometra, Alemanha);
- Transiluminador ultravioleta (U.V.) (Uvitec, Reino Unido).
- Brometo de etídio (10 mg/mL) (Invitrogene, EUA);
- Agarose (Acros, Bélgica);
- Tampão tris-borato EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) (TBE)
- IX. Procedimento descrito no Anexo E;
- Solução de deposição. Procedimento descrito no Anexo E;
- Amostras de DNA bacteriano obtido por extração simples.
- Procedimento experimental:
  - Num erlenmeyer a 3 g de agarose adiciona-se 300 mL de tampão TBE;
  - Aquece-se a mistura no Micro-ondas até total dissolução do pó;
  - Arrefece-se até à temperatura ambiente;
  - Adiciona-se 15 µL de brometo de etídio;
  - Verte-se a mistura no suporte de electroforese com os pentes previamente colocados. Deixa-se arrefecer;
  - Coloca-se o suporte com o gel na tina de electroforese previamente preenchida com o tampão TBE de modo a cobrir totalmente o gel;
  - Retirara-se os pentes;
  - Mistura-se a amostra com a solução de deposição na razão de 3:1;
  - As amostras misturadas com a solução de deposição distribuem-se pelos poços do gel;
  - Mantem-se o gel de agarose com as amostras a uma voltagem de 200 V durante 1 hora;
  - Os resultados obtidos leem-se no transiluminador U.V.

## Anexo C

### Amplificação do DNA por PCR-Multiplex

A reação de PCR permite amplificar enzimaticamente e *in vitro* uma sequência de DNA específica. A mistura de reação contém DNA, 2 Oligonucleótidos iniciadores (OIs

ou *primers*) de cadeia simples, uma DNA polimerase termoestável, desoxiribonucleósidos trifosfatados (dNTPs) e tampão do enzima.

A base teórica da PCR baseia-se na adição de dNTPs à cadeia de DNA iniciadora. O DNA é desnaturado pela ação do calor. Em seguida, e após diminuição da temperatura, cada OI hibrida com uma sequência específica de uma das cadeias, de tal forma que em conjunto flanqueiam a região a amplificar. Estas pequenas regiões de cadeia dupla permitem que a Taq polimerase inicie a síntese de duas novas cadeias de DNA na direção 5' → 3', utilizando os dNTPs da mistura da reação e após ser atingida a temperatura ótima de ativação do enzima.

Em ciclos consecutivos, os produtos da PCR aumentam exponencialmente. Numa reação de PCR realizam-se cerca de 20-30 ciclos de desnaturação, ligação de OIs e síntese, (*denaturation*, *annealing* e *elongation*) o que permite obter vários milhões de cópias da sequência de DNA de interesse.

O PCR-Multiplex envolve a amplificação simultânea de várias sequências de DNA numa única reação de PCR. A mistura de reação contém vários pares de Oligonucleótidos iniciadores (OIs), que devem ser desenhados de modo a não interagirem entre si e a originarem produtos de PCR de tamanhos diferentes, passíveis de serem adequadamente separados em géis de agarose.

## Procedimento experimental

- Material e reagentes
  - Câmara de Fluxo laminar (Astec Microflow advanced biosafety cabinet, Reino Unido);
  - Micropipetas 10 µL, 100 µL, 200 µL e 1000 µL (BioHit, Alemanha);
  - Pontas de micropipeta com filtro (BioHit, Alemanha);
  - Gelo;
  - Microtubos de 1,5 mL (Eppendorf, Alemanha);
  - Microtubos de PCR (BioRad, EUA);
  - Termociclador (BioRad, EUA);
  - Água destilada;
  - Tampão PCR (10X) (Promega, EUA);
  - dNATPs 10 mM cada (Promega, EUA);
  - OIs 10 pM (Invitrogene, EUA);



- $MgCl_2$  50 mM (Promega, EUA);
- Tap polimerase 5 U/ $\mu$ L (Promega, EUA);
- DNA bacteriano resultante da extração simples.
- Procedimento experimental:
  - Prepara-se uma mistura de reação de acordo com o que é descrito na tabela 5 e pela ordem apresentada, tendo em conta o número de amostras a trabalhar;
  - Depois de distribuir 23  $\mu$ L da mistura de reação a cada microtubo de PCR adiciona-se o DNA numa câmara de fluxo laminar independente;
  - Prepara-se um controlo negativo com os reagentes da PCR excetuando o DNA bacteriano.

**Tabela 5:** Mistura de reação utilizada quer na PCR1 quer na PCR2.

Reagentes	Volume por amostras ( $\mu$ L) PCR1	Volume por amostras ( $\mu$ L) PCR2
H <sub>2</sub> O destilada	10,00	11,00
Tampão de PCR (10x)	5,00	5,00
dNTPs (10 mM cada)	1,00	1,00
OIs (10 pM)	0,10	0,10
$MgCl_2$ (50 mM)	5,00	5,00
Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ L)	0,40	0,40
DNA bacteriano	2,00	2,00
Volume final	25,00	25,00

- Os reagentes são armazenados a -20 °C;
- O enzima mantém-se em gelo até à sua utilização;
- Coloca-se os microtubos de PCR no termociclador que se programa de acordo com os ciclos descritos na tabela 6.

**Tabela 6:** Ciclos utilizados na PCR 1 e PCR 2.

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de repetições
$t_1$ Desnaturação	94°C	3 minutos	1
$t_2$ Desnaturação	94°C	30 segundos	25
$t_3$ Hibridação	58°C	30 segundos	
$t_4$ Extensão	68°C	3 minutos	
$t_5$ Finalização	72°C	10 minutos	1

## Anexo D

### Separação dos fragmentos por electroforese em gel de agarose 2% (m/v)

A electroforese consiste na migração de partículas carregadas por ação de um campo elétrico. No caso particular das moléculas de DNA, a sua carga total negativa resultante dos grupos fosfato implica que estas sejam aplicadas junto ao cátodo e migrem através de um suporte sólido em direção ao ânodo. Nestas condições, a mobilidade electroforética das moléculas de DNA depende do tamanho e conformação das mesmas, do que resulta uma separação eficaz. A velocidade de migração é tanto maior quanto menor o seu tamanho.

Às amostras de DNA é adicionada solução de deposição antes da sua aplicação no gel. Este procedimento permite, por um lado, corar (azul de bromofenol) e aumentar a densidade (sacarose) da amostra facilitando a sua aplicação.

O brometo de etídeo é adicionado ao gel durante a sua preparação e permite visualizar os fragmentos de DNA sob luz UV. Este composto possui um grupo planar que é intercalado entre as bases dos ácidos nucleicos. Quando iluminado com UV (260-360 nm) apresenta a fluorescência a 560 nm (vermelho-alaranjado), sendo a intensidade de fluorescência proporcional à quantidade de DNA.

Durante a sua utilização é importante o uso de luvas pelo operador devido ao risco cancerígeno deste reagente.

Em todos os géis de electroforese são aplicados marcadores de peso molecular, que após a separação electroforética permitem estimar o tamanho e a concentração dos fragmentos de DNA da amostra.

- Material e reagentes:
  - Erlenmeyer de 500 mL (Marien Feld, Alemanha);
  - Balança de precisão (Precisa 4000C, Suíça);
  - Micro-ondas (Samsung, Coreia do Sul);
  - Provetas de 1000 mL  $\pm$  10,00 mL (Duran Linex,);
  - Micropipetas de 20  $\mu$ L (BioHit, Alemanha);
  - Tina de electroforese (Compact L/XL biometra, Alemanha);

- Transiluminador ultravioleta (U.V.) (Uvitec, Reino Unido);
- Brometo de etídeo (10 mg/mL), (Invitrogene, EUA);
- Agarose (Acros, Bélgica);
- Tampão TBE 1X. Procedimento descrito no Anexo E;
- Solução de deposição. Procedimento descrito no Anexo E;
- Marcador Molecular com intervalos de 100 p.b. (Nzytech, Portugal);
- Fragmentos de DNA resultantes da PCR-Multiplex 1 e 2.
- Procedimento experimental:
  - Num erlenmeyer a 6 g de agarose adiciona-se 300 mL de tampão TBE;
  - Aquece-se a mistura no micro-ondas até total dissolução do pó;
  - Arrefece-se até a mistura atingir a temperatura ambiente;
  - Adiciona-se 15  $\mu$ L de brometo de etídeo;
  - Verte-se a mistura no suporte de electroforese com os pentes previamente colocados e deixa-se solidificar;
  - Coloca-se o suporte com o gel na tina de electroforese previamente preenchida com o tampão TBE de modo a cobrir totalmente o gel;
  - Retira-se os pentes;
  - Ao marcador molecular utilizado (3,5  $\mu$ L) adiciona-se 2  $\mu$ L solução de deposição;
  - Em cada poço distribui-se 8 $\mu$ L de amostras;
  - Mantem-se o gel de agarose com as amostras a uma voltagem de 200 V durante 2,5 horas;
  - Os resultados obtidos leem-se num transiluminador U.V

## Anexo E

### Preparação de reagentes utilizados nos procedimentos experimentais acima descritos

#### TBE 10 X (tampão 0,89 M TRIS borato / 0,02 M EDTA)

- Material e Reagentes
  - Balão volumétrico de 1 L (Simax, República Checa);
  - Balança de precisão (Preciosa 4000C, Suíça);
  - Micropipetas 1000  $\mu$ L (BioHit, Alemanha);
  - Pontas de micropipetas (BioHit, Alemanha);
  - Proveta de 1000 mL  $\pm$  10,00 mL (Simax, República Checa);
  - Proveta de 100 mL  $\pm$  0,50 mL (Simax, República Checa);
  - 108 g de Tris base (Sigma, EUA);
  - 55 g Ácido bórico (Merck, EUA);
  - 7,4 g EDTA disódico (Sigma, EUA);
  - HCl (Sigma, EUA);
  - Água bidestilada;
- Procedimento experimental
  - Num balão volumétrico de 1 L adiciona-se os reagentes sólidos e água bidestilada não perfazendo o volume total;
  - Ajusta-se o pH a 8 com HCl concentrado;
  - Perfaz-se o volume com água destilada;
  - Autoclava-se a 121 °C durante 15 minutos;
  - Esta solução de *stock* (10X) é armazenada à temperatura ambiente durante 1 ano;
  - Para a realização das electroforeses utiliza-se uma solução de trabalho (1X);
  - Dilui-se 100 mL da solução de *stock* em 900 mL de água bidestilada.

#### Solução de deposição

- Material e reagentes
  - 2 Balão volumétrico de 100 mL (Simax, República Checa);
  - Balança de precisão (Precisa 4000C, Suíça);
  - Água destilada;

- Micropipetas de 1000  $\mu\text{L}$  (BioHit, Alemanha);
- 50 g de sacarose (50% p/v) (Merck, USAUSA);
- 10 mg de azul de bromofenol (10 mg/mL) (Riedel-de Haën, Alemanha).
- Procedimento experimental
  - Dissolve-se 50 g de sacarose em 100 mL de água destilada num balão volumétrico
  - Dissolve-se 10 mg de azul de bromofenol em 1 mL de água destilada num balão volumétrico;
  - A 500  $\mu\text{L}$  da solução de azul de bromofenol adiciona-se 500  $\mu\text{L}$  da solução de sacarose;
  - Esta solução de deposição pode ser armazenada a 4 °C durante um ano.

