

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Investigação de Genes do Sistema de Secreção do Tipo III em
Cepas de *Escherichia coli* Patogênicas Aviárias**

NAÍTA ROMAN BOHN

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Fabiana Horn

Trabalho apresentado como conclusão de curso para obtenção do título de
Bacharel em Biologia Molecular, Celular e Funcional

Porto Alegre, 2011.

2

3 Investigação de Genes do Sistema de Secreção do Tipo III em Cepas
4 de *Escherichia coli* Patogênicas Aviárias

5 Naíta Roman Bohn¹ e Fabiana Horn¹

6

7 ¹ Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
8 Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-570 Porto Alegre, RS, Brasil

9

10 **Resumo**

11

12 As cepas de *Escherichia coli* patogênicas aviárias (APEC) são os agentes
13 etiológicos da colibacilose em aves, doença caracterizada por infecções
14 principalmente extraintestinais, que causa grande prejuízo econômico na
15 avicultura. Embora os fatores determinantes de virulência de APEC venham
16 sendo bastante estudados, os mecanismos envolvidos na patogênese não
17 estão completamente elucidados. Os sistemas de secreção do tipo III (T3SS)
18 são importantes fatores de virulência em bactérias gram-negativas, pois
19 permitem que proteínas efetoras bacterianas sejam transladadas para dentro
20 do citoplasma das células do hospedeiro, onde modulam diversas funções
21 biológicas, como expressão gênica, progressão do ciclo celular e funções
22 bioquímicas. O objetivo deste trabalho é avaliar a presença de genes
23 conservados do T3SS em cepas APEC. Primeiramente, foi feita uma busca
24 no banco de dados do National Center for Biotechnology (NCBI) pelos genes

25 *escC*, *escJ*, *escN* e *escV* do T3SS no genoma de APEC (APEC O1) e em 7
26 plasmídeos de APEC seqüenciados; todos foram negativos para os genes
27 pesquisados. Além disso, analisamos por PCR a presença dos genes *escC*
28 e *escV* em 66 cepas APEC. O DNA das cepas foi obtido através do método
29 da simples fervura; os genes de interesse foram amplificados e os
30 fragmentos foram resolvidos através de eletroforese em gel de agarose e
31 visualizados com brometo de etídio. Como controle positivo foi utilizada uma
32 cepa de *E. coli* enteropatogênica. Todas as cepas APEC foram negativas
33 para presença dos genes *escV* e *escC*. Nossos resultados sugerem que o
34 T3SS não é um determinante de virulência em cepas APEC.

35 **Introdução**

36

37 *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo, importante membro da
38 microbiota intestinal normal da maioria dos animais. As cepas comensais
39 raramente causam doenças, exceto em hospedeiros imunocomprometidos,
40 ou quando há rompimento das barreiras gastrointestinais. Entretanto,
41 existem clones de *E. coli* que adquiriram atributos de virulência específicos,
42 que os permitem se adaptarem a novos nichos e causarem vários tipos de
43 doenças. Esses atributos de virulência são frequentemente encontrados em
44 elementos genéticos móveis, que podem levar ao surgimento de novas
45 combinações de fatores de virulência, ou podem encontrar-se em elementos
46 genéticos que uma vez foram móveis, mas que evoluíram, tornando-se fixos
47 no genoma (16).

48 As *E. coli* patogênicas podem ser classificadas em dois grandes grupos, as
49 patogênicas intestinais (InPEC, de Intestinal Pathogenic *E. coli*) e as
50 patogênicas extraintestinais (ExPEC, de Extraintestinal Pathogenic *E. coli*).
51 As InPEC são responsáveis pelas diarreias e podem apresentar diversas
52 estratégias para colonizar o epitélio intestinal, o que, para alguns patotipos,
53 inclui a invasão de células intestinais (19, 26). Assim, as InPEC podem ser
54 agrupadas em seis categorias: *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli*
55 entero-hemorrágicas (EHEC), *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), *E. coli*
56 enteroagregativas (EAEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) e *E. coli*
57 difusamente aderentes (DAEC) (16).

58 As ExPEC, por sua vez, são classificadas em três subgrupos principais: as
59 causadoras de infecção do trato urinário (UPEC, de UroPathogenic *E. coli*);

60 as causadoras de meningite no neonato (NMEC, de Newborn Meningitis-
61 causing *E. coli*); e as que causam colibacilose em aves (APEC, de Avian
62 Pathogenic *E. coli*) (16).

63 As APEC estão principalmente relacionadas a infecções do trato respiratório
64 ou infecções sistêmicas. A colibacilose é uma das principais doenças
65 infecciosas na indústria aviária, levando a significativas perdas econômicas
66 na indústria aviária mundial (5, 9). Dependendo do status de virulência da
67 cepa e de fatores predisponentes do hospedeiro, a infecção manifesta-se
68 como uma septicemia inicial que é seguida por morte ou por infecção em
69 diferentes órgãos. As lesões mais comuns associadas à colibacilose são a
70 peri-hepatite, aerossaculite e pericardite, embora outras síndromes possam
71 ser encontradas (7). A rota usual de infecção por APEC não é claramente
72 definida, embora se acredita que a rota respiratória seja o modo mais
73 comum de entrada do patógeno. O principal fator predisponente para as
74 infecções sistêmicas é o estresse, que pode ser induzido por fatores
75 ambientais, como altas concentrações de amônia no ambiente, deficiência
76 no sistema de ventilação, exposição a extremos de temperatura, espaço
77 limitado para a criação e deficiência no processo de desinfecção dos
78 aviários. Além desses fatores, a existência de infecções por outros agentes,
79 como *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella*
80 *multocida*, *Haemophilus paragallinarum*, *Pneumovirus*, vírus da Bronquite
81 Infecciosa, doença de Marek e de New Castle, bem como a presença de
82 micotoxinas na ração, podem deixar a ave pré-disposta à infecção por APEC
83 (5, 7).

84 Trabalhos realizados por diferentes grupos têm registrado a capacidade de
85 invasão de algumas cepas APEC. Pourbakhsh e colaboradores, em 1997,
86 observaram a presença da cepa TK3 em vacúolos de células epiteliais dos
87 sacos aéreos de aves infectadas experimentalmente (25). A cepa MT78, por
88 sua vez, foi capaz de invadir células microendotélias do cérebro humano
89 (HBMEC) (3, 11), fibroblastos aviários da linhagem CEC-32 (24), hepatócitos
90 aviários da linhagem LMH e pneumócitos humanos da linhagem A549 (2). A
91 cepa APEC DE205B invadiu fibroblastos de galinha da linhagem DF-1 (31).

92 A elucidação dos mecanismos subjacentes à patogênese bacteriana é um
93 dos principais objetivos da pesquisa microbiológica. A interação de bactérias
94 patogênicas com as células do hospedeiro é mediada por fatores que estão
95 localizados na superfície da bactéria e/ou que são secretados. As proteínas
96 bacterianas secretadas apresentam uma ampla variedade de funções, que
97 incluem a proteólise, hemólise e citotoxicidade, entre outras (12). Assim,
98 sistemas de secreção de proteínas bacterianas são importantes na virulência
99 bacteriana e adaptação da bactéria ao ambiente. Existem seis sistemas de
100 secreção descritos para bactérias gram-negativas, os sistemas de secreção
101 do tipo I ao VI. Os sistemas de secreção do tipo II e V secretam ao meio
102 extracelular proteínas bacterianas que foram transladadas ao espaço
103 periplasmático através dos sistemas Sec e Tat. Os sistemas de secreção do
104 tipo I, III, IV e VI, por sua vez, secretam proteínas bacterianas através das
105 membranas interna e externa em um único passo. Além disso, os sistemas
106 de secreção do tipo III, IV e VI possuem aparatos para injetar proteínas
107 bacterianas diretamente no citosol da célula eucariótica (29).

108 Os T3SS são mediadores essenciais da interação de muitas bactérias gram-
109 negativas com hospedeiros humanos, animais ou plantas, e sabe-se que são
110 determinantes de invasão de bactérias patogênicas, como EIEC, *Shigella*,
111 *Salmonella* e *Yersinia* nas células hospedeiras. Existem muitas similaridades
112 de sequência e função entre os componentes do T3SS de bactérias que
113 afetam os mais diferentes organismos (28). Como dito acima, os T3SS
114 transladam proteínas bacterianas para o interior de células hospedeiras.
115 Eles são vistos como um aparato de transferência de proteínas inter-reino,
116 que são capazes de injetar substratos proteicos diversos através das duas
117 membranas bacterianas e da membrana eucariótica até o citosol eucariótico.
118 É disparado quando existe proximidade entre patógeno e hospedeiro e
119 funciona *in vitro* sob condições que mimetizam parâmetros importantes do
120 ambiente do hospedeiro (28). Eles são compostos de numerosas proteínas
121 que formam um canal estreito através do qual os substratos são
122 transportados com gasto de ATP. Os T3SS transladam várias proteínas
123 efetoras, que modulam funções bioquímicas do hospedeiro, como a
124 estrutura do citoesqueleto, a morte celular programada, a progressão do
125 ciclo celular, o tráfego endocítico e a expressão gênica (23). A maquinaria de
126 secreção é altamente conservada, consistindo de mais de 20 proteínas,
127 codificadas em genes que se encontram em grandes plasmídios ou fixados
128 no genoma em ilhas de patogenicidade. Esses sistemas são homólogos aos
129 sistemas utilizados para transladar macromoléculas em contextos não-
130 patogênicos, como o sistema de exportação do flagelo e em contextos de
131 simbiose. Um subconjunto de 8 a 10 proteínas são altamente conservadas
132 entre os T3SS e os sistemas de exportação flagelares (23, 28).

133 Entre os genes conservados relacionados ao corpo basal do T3SS,
134 encontrados em *E. coli*, podem ser citados *escC*, *escJ*, *escN* e *escV*. O gene
135 *escC* codifica uma secretina de membrana externa; *escJ* codifica uma
136 proteína de membrana interna que se oligomeriza, formando uma estrutura
137 em forma de anel; *escN* codifica uma ATPase, que supostamente está
138 envolvida no fornecimento de energia para a secreção através do T3SS, e
139 *escV* codifica uma proteína de membrana interna (Figura 1) (23, 28). A
140 presença desses genes é, então, um indício de utilização desse sistema no
141 mecanismo de patogênese.

142 Embora o T3SS esteja associado a bactérias patogênicas, ele já foi
143 encontrado em bactérias comensais e simbioses de plantas (28).

144 Neste contexto, dada a importância dos T3SS em bactérias gram-negativas,
145 e dada a observação de que algumas cepas APEC foram invasivas em
146 células não-fagocitárias, o objetivo deste trabalho é investigar a presença de
147 genes conservados do T3SS nos genomas de APEC sequenciados e fazer
148 uma triagem dos mesmos, através de PCR, em isolados de APEC oriundos
149 de aves com colibacilose. Com isso, espera-se contribuir para o
150 entendimento da virulência de APEC.

151 **Materiais e métodos**

152

153 **Cepas bacterianas e condições de cultivo**

154

155 Neste estudo, foram analisados 57 isolados de APEC, obtidos de frangos de
156 corte com infecção sistêmica (colissepticemia), provenientes de abatedouros
157 da região metropolitana de Porto Alegre, no estado do Rio Grande do Sul.
158 As amostras foram coletadas no período de setembro de 2007 a janeiro de
159 2008 e foram isoladas de frangos com idade média de 49 dias, recém
160 sacrificados, a partir da carcaça e de diferentes órgãos da ave, incluindo
161 coração, sacos aéreos, fígado e intestino. As amostras foram fornecidas pelo
162 Dr. Benito de Guimarães Brito do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério
163 Finamor.

164 Também foram analisadas outras cepas de nossa coleção: as APEC
165 brasileiras UEL13, UEL17, UEL29, UEL31 (30); a APEC francesa MT78 (6);
166 as APEC norte-americanas APEC O1 (15) e A2363 (14); as APEC alemãs
167 IMT5155 (1) e IMT2470 (9); e as cepas de *E. coli* isoladas do intestino de
168 aves saudáveis FN14, brasileira (gentilmente cedida por Marilda Vidotto) e
169 IMT5104, alemã (22).

170 Como controle negativo para os experimentos de PCR, foi utilizada uma *E.*
171 *coli* K-12 e como controle positivo foi utilizada a cepa EPEC P2005/03
172 (O108:H9), gentilmente cedida por Sylvia Kleta (20).

173 Todas as cepas foram mantidas em estoques em caldo Lúria Bertani (LB)
174 com 20% de glicerol, armazenadas a -80°C. Para a obtenção de DNA

175 bacteriano utilizado nos experimentos de PCR, as cepas foram plaqueadas
176 em ágar LB e incubadas a 37°C durante a noite.

177

178 **Oligonucleotídeos iniciadores**

179

180 Neste trabalho, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores para amplificar
181 regiões conservadas dos genes *escC*, *escV*, *escJ* e *escN* do T3SS (Tabela
182 1). Os oligonucleotídeos foram desenhados por Kyaw e colaboradores (21),
183 a partir de comparações desses genes da cepa EPEC E2348/69 com os
184 genes homólogos em outros patógenos gram-negativos. Também foram
185 utilizados oligonucleotídeos iniciadores para amplificar uma segunda região
186 do gene *escV*, desenhados por Ewers e colaboradores (10). A utilização de
187 um segundo par de oligonucleotídeos iniciadores para o gene *escV* justifica-
188 se pelo fato de que este segundo par já havia sido utilizado em estudos
189 anteriores do nosso grupo de pesquisa. Todos os oligonucleotídeos
190 iniciadores foram utilizados nas análises *in silico*. Para os ensaios de PCR,
191 foram utilizados apenas os oligonucleotídeos C1, C2, V1 e V2.

192

193 **Análises *in silico***

194

195 A fim de determinar se o T3SS está presente em cepas APEC, foi feita uma
196 busca no banco de dados do Genome Project do National Center for
197 Biotechnology (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>) pelos
198 genes conservados *escC*, *escJ*, *escN* e *escV* no genoma sequenciado de
199 APEC (APEC O1) e nos plasmídios de APEC sequenciados pAPEC-O2-

200 ColV, pTJ100, pAPEC-O1-ColBM, pAPEC-O1-R, pAPEC-O2-R, pAPEC-
201 O103-ColBM, pAPEC-1. Também foi feita a busca pelos mesmos genes na
202 cepa UPEC CFT073. Como controles positivos foram utilizadas as cepas
203 EPEC E2348/69 (O127:H6), EHEC EDL933 (O157:H7) e EHEC 12009
204 (O103:H2) e para controle negativo foi utilizada *E. coli* K-12.

205 Oligonucleotídeos iniciadores para os genes *escC*, *escJ*, *escN* e para duas
206 regiões diferentes do gene *escV* (Tabela 1) foram testados por PCR *in silico*
207 através dos programas Vector NTI versão 10.3 e pDRAW32 versão 1.1.110.
208 Para controles positivos foram utilizados os genomas das cepas EHEC
209 EDL933, EHEC 12009 e EPEC E2348/69 e para controle negativo foi
210 utilizada *E. coli* K-12. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram
211 calculados e a sequência amplificada foi verificada através do NCBI BLAST
212 online (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

213

214 **Obtenção de DNA e condições de PCR**

215

216 As amostras de DNA bacteriano foram obtidas através do método de fervura.
217 Três a quatro colônias bacterianas foram suspendidas em um tubo contendo
218 200 µL de água Milli-Q estéril. Os tubos foram incubados a -20 °C por 10
219 minutos e, imediatamente após, foram incubados em banho a 100 °C por 10
220 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas a 14000 g por 10 minutos
221 e armazenadas a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados como DNA molde
222 nos ensaios de PCR.

223 As cepas de *E. coli* foram testadas para presença dos genes *escV* e *escC*
224 através de PCR, com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores V1 e V2,

225 C1 e C2 (Tabela 1), respectivamente. As reações foram feitas utilizando uma
226 mistura de 25 µL contendo tampão de PCR 1X, 0,8 µM do par de
227 oligonucleotídeos iniciadores, 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂, 2 U
228 de Taq DNA-polimerase (CENBIOT) e 4 µL de amostra de DNA,
229 suplementado com o volume apropriado de água Milli-Q. As reações foram
230 conduzidas em termociclador (PCR Sprint, Thermo) nas seguintes
231 condições: 94 °C por 3 minutos, 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C
232 (para *escC*) ou 57 °C (para *escV*) por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto,
233 seguido por uma extensão adicional a 72 °C por 10 minutos, após a qual
234 foram mantidas a 4 °C. Como controle positivo, foi utilizada a cepa EPEC
235 P2005/03 (O108:H9) e, como controle negativo, foi utilizada *E. coli* K-12. Os
236 produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% e
237 os amplicons foram corados com brometo de etídio, fotografados sob luz UV
238 e seu tamanho foi determinado por comparação com um marcador de 100
239 pb (Ludwig Biotec).

240 **Resultados**

241

242 **Análises *in silico***

243

244 Através da busca pelos genes conservados do T3SS *escC*, *escJ*, *escN* e
245 *escV* feita no banco de dados do Genome Project do NCBI, foi verificada a
246 ausência de todos os genes pesquisados no genoma de APEC O1, nos sete
247 plasmídios de APEC disponíveis e na cepa UPEC CFT073. Foi possível
248 verificar a presença de todos os genes do T3SS pesquisados nos genomas
249 dos controles positivos utilizados, as cepas EPEC E2348/69, EHEC EDL933
250 e EHEC 12009.

251 Utilizando os programas Vector NTI e pDRAW32, foram testados os
252 oligonucleotídeos iniciadores usados neste trabalho em genomas de *E. coli*
253 disponíveis no banco de dados do Genome Project do NCBI. Para controle
254 negativo, foram utilizados os genomas das cepas K-12 e APEC O1.
255 Conforme o esperado, não há sítio de anelamento para os oligonucleotídeos
256 iniciadores nestes genomas, pois eles não apresentam o T3SS.

257 Utilizando o programa pDRAW32, foi observado que todos os
258 oligonucleotídeos iniciadores anelam para EHEC EDL933 e EPEC
259 E2348/69. Para EHEC 12009, somente N1, N2, J1, J2, III System forward e
260 reverse anelaram (Figura 2).

261 Para todos os oligonucleotídeos iniciadores que anelaram, foi calculado,
262 utilizando pDRAW32, o tamanho do fragmento amplificado (Tabela 2). Pode-
263 se verificar que, para cada par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados, o
264 tamanho do fragmento amplificado foi igual em todas as cepas analisadas.

265 Além disso, quando testadas no BLAST, as sequências amplificadas *in silico*
266 corresponderam ao gene de interesse.

267 O programa Vector NTI versão 10.3 também foi utilizado para a mesma
268 análise de PCR *in silico*, confirmando os resultados da Tabela 2 (dados não
269 mostrados). O mesmo programa foi utilizado para analisar detalhadamente o
270 anelamento de todos os oligonucleotídeos iniciadores em todos os genomas
271 testados, a fim de identificar possíveis diferenças nas sequências de
272 nucleotídeos que explicariam a ausência de amplificação de *escC* com os
273 iniciadores C1 e C2 e de *escV* com os iniciadores V1 e V2 em EHEC 12009
274 (Tabela 3). O genoma utilizado para desenhar os iniciadores foi o da cepa
275 EPEC E2348/69 e, portanto, a identidade entre a sequência genômica e
276 cada sequência de iniciadores foi total. O mesmo foi observado para a cepa
277 EHEC EDL933, com exceção do oligonucleotídeo N1, em que se observou
278 um mau pareamento. A cepa EHEC 12009 caracterizou-se por apresentar
279 mau pareamento em vários oligonucleotídeos: um nucleotídeo mal-pareado
280 em J1, J2, N1 e III System forward; dois nucleotídeos mal-pareados em C2 e
281 em V2 e três em C1. Esses resultados explicam o observado na Figura 2,
282 pois no programa utilizado, um dos parâmetros empregados levava em
283 consideração a ocorrência de no máximo um mau pareamento.

284

285 **PCR dos Genes *escC* e *escV***

286

287 Um total de 68 cepas de *E. coli* foram testadas através de PCR para a
288 presença dos genes *escC* e *escV*, das quais apenas FN14 foi positiva para
289 os dois genes. Cabe ressaltar que esta cepa foi isolada do intestino de uma

290 ave saudável. O restante das cepas, que inclui todas as APEC, não
291 amplificou nenhum dos dois genes investigados nas condições de PCR
292 utilizadas (Figura 3).

293 **Discussão**

294

295 Neste trabalho, não detectamos *in silico* sítios de anelamento para os
296 iniciadores dos genes conservados do T3SS no genoma de APEC O1,
297 tampouco nos sete plasmídios de APEC disponíveis. Isso está de acordo
298 com a observação de Dias da Silveira e colaboradores (comunicação
299 pessoal), que não detectaram os seguintes genes do T3SS nas cepas APEC
300 S17, S607, O8 e S362, cujos genomas foram por eles sequenciados: *escC*,
301 *escD*, *escF*, *escJ*, *escN*, *escS*, *escT*, *escU*, *espA*, *espB*, *espD*, *ler*, *sepD*,
302 *sepL*, *sepQ* e *tir*. Cabe ressaltar que não há relatos da presença do T3SS
303 em cepas APEC.

304 Também não detectamos *in silico* os genes do T3SS no genoma da UPEC
305 CFT073. Esse resultado não é surpreendente, uma vez que, embora as
306 cepas UPEC tenham a capacidade de invadir células epiteliais de bexiga e
307 de rim, não foram identificados sistemas de secreção que respondam por
308 esse mecanismo. Por outro lado, vários trabalhos referem à importância da
309 presença de fímbria do tipo 1 no processo de adesão e invasão de UPEC
310 (13).

311 Três cepas que sabidamente apresentam o T3SS foram testadas *in silico*
312 quanto ao anelamento dos iniciadores e o tamanho da sequência
313 amplificada. Observou-se que a cepa EHEC 12009 não apresentou
314 anelamento (Fig. 2) e conseqüentemente não houve amplificação dos genes
315 *escC* e *escV*, com os iniciadores C1, C2 e V1, V2, respectivamente (Tabela
316 2). Esse fato pode ser explicado pelo elevado número de mutações no
317 fragmento genômico analisado. No entanto, é possível questionar se essas

318 mutações impediriam a amplificação desses genes em um experimento de
319 PCR sob condições menos restritivas.

320 Em relação ao tamanho dos fragmentos amplificados por PCR *in silico*,
321 pode-se verificar que os mesmos foram iguais em todas as cepas (Tabela 2)
322 e, conforme o esperado, semelhantes aos tamanhos de fragmentos obtidos
323 no trabalho de Kyaw e colaboradores, utilizado como referência (21).

324 Os resultados obtidos por PCR para os dois genes (*escC* e *escV*) nas 66
325 cepas APEC e nas duas cepas intestinais testadas estão em concordância
326 com os resultados obtidos *in silico*. Conforme o esperado, não foi detectada
327 a presença dos genes nas cepas APEC, dando sustentação à idéia de
328 ausência do T3SS em APEC. A cepa APEC MT78, comprovadamente
329 invasiva em células não-fagocitárias, testada neste trabalho, não apresenta
330 o T3SS, sugerindo que outros mecanismos de invasão devem estar
331 envolvidos. Recentemente, foi verificada a presença do sistema de secreção
332 do tipo VI nas cepas APEC 362 e MT78, e o papel desse sistema na
333 patogenicidade está sendo investigado (4, 27). A única cepa em que
334 observamos a amplificação dos dois genes testados foi FN14, isolada do
335 intestino de uma ave saudável. Pelo fato do T3SS estar associado à
336 virulência de *E. coli* patogênicas, a observação que uma cepa intestinal
337 apresentou genes do T3SS sugere que o intestino de aves saudáveis possa
338 ser reservatório de *E. coli* enteropatogênicas. Sabe-se que o intestino de
339 aves é reservatório de APEC (8).

340 Nos outros tipos de *E. coli* patogênicas extraintestinais, UPEC e NMEC,
341 cujos mecanismos de invasão são mais conhecidos do que os de APEC,
342 também não foi relatada, até o momento, a presença de T3SS, sugerindo

343 que esse sistema não explica a propriedade invasiva dessas ExPEC. Em
344 NMEC, sabe-se que são as invasinas codificadas pelos genes *ibeA* e *gimB*
345 que estão relacionadas à invasão (17-18).

346 Para as 66 cepas APEC foram analisados por PCR apenas dois genes.
347 Talvez os iniciadores escolhidos pudessem ter sido mais conservados. A
348 análise por PCR dos outros genes pertencentes a esse sistema seria
349 interessante para elucidar se a ausência da amplificação foi devida à
350 ausência do gene, ou simplesmente devida a uma baixa conservação da
351 região de anelamento dos iniciadores. No entanto, todos os dados obtidos
352 neste trabalho apontam para a ausência de T3SS em APEC, sugerindo que
353 a capacidade de invasão tenha outros mecanismos envolvidos.

354 **Referências**

355

- 356 1. **Antão, E.-M., S. Glodde, G. Li, R. Sharifi, T. Homeier, C. Laternus,**
357 **I. Diehl, A. Bethe, H.-C. Philipp, R. Preisinger, L. H. Wieler, and C.**
358 **Ewers.** 2008. The chicken as a natural model for extraintestinal
359 infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC).
360 *Microbial Pathogenesis* **45**:361-369.
- 361 2. **Chanteloup, N. K., G. Porcheron, B. Delaleu, P. Germon, C.**
362 **Schouler, M. Moulin-Schouleur, and P. Gilot.** 2011. The extra-
363 intestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 invades
364 avian and human epithelial cells and survives intracellularly.
365 *Veterinary Microbiology* **147**:435-439.
- 366 3. **Cortes, M. A., J. Gibon, N. K. Chanteloup, M. Moulin-Schouleur, P.**
367 **Gilot, and P. Germon.** 2008. Inactivation of *ibeA* and *ibeT* results in
368 decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic
369 *Escherichia coli* strain BEN2908. *Infection and Immunity* **76**:4129-
370 4136.
- 371 4. **de Pace, F., G. Nakazato, A. Pacheco, J. Boldrin de Paiva, V.**
372 **Sperandio, and W. Dias da Silveira.** 2010. The Type VI Secretion
373 System Plays a Role in Type 1 Fimbria Expression and Pathogenesis
374 of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain. *Infect. Immun.*
375 **78**:4990-4998.
- 376 5. **Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic
377 *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research* **30**:299-316.

- 378 6. **Dho, M., and J. P. Lafont.** 1982. *Escherichia coli* Colonization of the
379 Trachea in Poultry: Comparison of Virulent and Avirulent Strains in
380 Gnotoxenic Chickens. *Avian Diseases* **26**:787-797.
- 381 7. **Dziva, F., and M. P. Stevens.** 2008. Colibacillosis in poultry:
382 unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic
383 *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology* **37**:355- 366.
- 384 8. **Ewers, C., E.-M. Antão, I. Diehl, H.-C. Philipp, and L. H. Wieler.**
385 2009. Intestine and Environment of the Chicken as Reservoirs for
386 Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains with Zoonotic
387 Potential. *Applied Environmental Microbiology* **75**:184-192.
- 388 9. **Ewers, C., G. Li, H. Wlinking, S. Kiebling, K. Alta, E.-M. Antão, C.**
389 **Laternus, I. Diehla, S. Glodde, T. Homeiera, U. Bohnke, H. Steinru,**
390 **H.-C. Philipp, and L. H. Wieler.** 2007. Avian pathogenic,
391 uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How
392 closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*
393 **297**:163-176.
- 394 10. **Ewers, C., P. Schierack, M. Nordhoff, F. Horn, and L. H. Wieler.**
395 2008. Identification and Characterization of Intimin Gene (*eae*)-
396 positive strains among Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*
397 (ExPEC), p. 386-417. *Tagung der Fachgruppe*, vol. 121. Berliner und
398 Münchener Tierärztliche Wochenschrift, Braunschweig. Germany.
- 399 11. **Germon, P., Y. Chen, L. He, J. E. Blanco, A. Brée, C. Schouler, S.**
400 **Huang, and M. Moulin-Schouleur.** 2005. *ibeA*, a virulence factor of
401 avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **151**:1179-1186.

- 402 12. **Hueck, C. J.** 1998. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial
403 Pathogens of Animals and Plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:379-
404 433.
- 405 13. **Hunstad, D. A., and S. S. Justice.** 2010. Intracellular lifestyles and
406 immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. *Annual*
407 *Review of Microbiology* **64**:203-221.
- 408 14. **Johnson, T. J., C. W. Giddings, S. M. Horne, P. S. Gibbs, R. E.**
409 **Wooley, J. Skyberg, P. Olah, R. Kercher, J. S. Sherwood, S. L.**
410 **Foley, and L. K. Nolan.** 2002. Location of Increased Serum Survival
411 Gene and Selected Virulence Traits on a Conjugative R Plasmid in an
412 Avian *Escherichia coli* Isolate. *Avian Diseases* **46**:342-352.
- 413 15. **Johnson, T. J., S. Kariyawasam, Y. Wannemuehler, P.**
414 **Mangiamele, S. J. Johnson, C. Doetkott, J. A. Skyberg, A. M.**
415 **Lynne, J. R. Johnson, and L. K. Nolan.** 2007. The Genome
416 Sequence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain O1:K1:H7
417 Shares Strong Similarities with Human Extraintestinal Pathogenic *E.*
418 *coli* Genomes. *J. Bacteriol.* **189**:3228-3236.
- 419 16. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley.** 2004. Pathogenic
420 *Escherichia coli*. *Nature Reviews - Microbiology* **2**:123-140.
- 421 17. **Kim, K. S.** 2008. Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain
422 barrier. *Nature Reviews - Microbiology* **6**:625-634.
- 423 18. **Kim, K. S.** 2003. Pathogenesis of bacterial meningitis: from
424 bacteraemia to neuronal injury. *Nature Reviews - Neuroscience* **4**:376-
425 385.

- 426 19. **Klemm, P., V. Hancock, and M. A. Schembri.** 2010. Fimbrial
427 adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. Environmental
428 Microbiology Reports **2**:628-640.
- 429 20. **Kleta, S., H. Steinrück, G. Breves, S. Duncker, C. Laternus, L. H.**
430 **Wieler, and P. Schierack.** 2006. Detection and distribution of
431 probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 clones in swine herds in
432 Germany. Journal of Applied Microbiology **101**:1357-1366.
- 433 21. **Kyaw, C. M., C. R. De Araujo, M. R. Lima, E. G. S. Gondim, M. M.**
434 **Brígido, and L. G. Giugliano.** 2003. Evidence for the presence of a
435 type III secretion system in diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC).
436 Infection, Genetics and Evolution **3**:111-117.
- 437 22. **Li, G., C. Laternus, C. Ewers, and L. H. Wieler.** 2005. Identification
438 of Genes Required for Avian *Escherichia coli* Septicemia by
439 Signature-Tagged Mutagenesis. Infection and Immunity **73**:2818-
440 2827.
- 441 23. **Marlovits, T. C., and C. E. Stebbins.** 2010. Type III secretion
442 systems shape up as they ship out. Current Opinion in Microbiology
443 **13**:47-52.
- 444 24. **Matter, L. B., N. L. Barbieri, M. Nordhoff, C. Ewers, and F. Horn.**
445 2011. Avian Pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken
446 fibroblasts. Veterinary Microbiology **148**:51-59.
- 447 25. **Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doizé, C. M.**
448 **Dozois, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 1997. Dynamics of
449 *Escherichia coli* Infection in Experimentally Inoculated Chickens. Avian
450 Diseases **41**:221-233.

- 451 26. **Reis, R. S., and F. Horn.** 2010. Enteropathogenic *Escherichia coli*,
452 *Samonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria
453 interactions in enteric diseases. *Gut Pathogens* **2**.
- 454 27. **Shrivastava, S., and S. S. Mande.** 2008. Identification and Functional
455 Characterization of Gene Components of Type VI Secretion System in
456 Bacterial Genomes. *PLoS One* **3**:e2955.
- 457 28. **Tampakaki, A. P., V. E. Fadouloglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos,**
458 **and M. Kokkinidis.** 2004. Conserved features of type III secretion.
459 *Cellular Microbiology* **6**:805-816.
- 460 29. **Tseng, T.-T., B. Tyler, and J. Setubal.** 2009. Protein secretion
461 systems in bacterial-host associations, and their description in the
462 Gene Ontology. *BMC Microbiology* **9**:S2.
- 463 30. **Vidotto, M., E. E. Müller, J. C. d. Freitas, A. A. Alfieri, I. G.**
464 **Guimarães, and D. S. Santos.** 1990. Virulence factors of avian
465 *Escherichia coli*. *Avian Diseases* **34**:531-538.
- 466 31. **Wang, S., C. Niu, Z. Shi, Y. Xia, M. Yaqoob, J. Dai, and C. Lu.** 2011.
467 Effects of *ibeA* Deletion on Virulence and Biofilm Formation of Avian
468 Pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **79**:279-287.
- 469

470 **Tabela 1.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo.

Gene	Oligonucleotídeo iniciador	Sequência de DNA (5'-3')	Referência
<i>escC</i>	C1	GTCAGCGACAGATATAACATAC	(21)
	C2	AACGCATTACCCCTAATC	
<i>escJ</i>	J1	CCAAAGAAATGGACAAAAGTGG	(21)
	J2	GACCGATGGTGCTAAGTTAACC	
<i>escN</i>	N1	CGCCTTTTACAAGATAGAAC	(21)
	N2	CATCAAGAATAGAGCGGAC	
<i>escV</i>	V1	CTAACTTCTTTCCCCACAATC	(21)
	V2	TATCCCCAACAGGCAAAC	
	III System forward	TTTTCCCTTGATGGTATGCC	(10)
	III System reverse	TTTACAACTTCATCGCCCC	

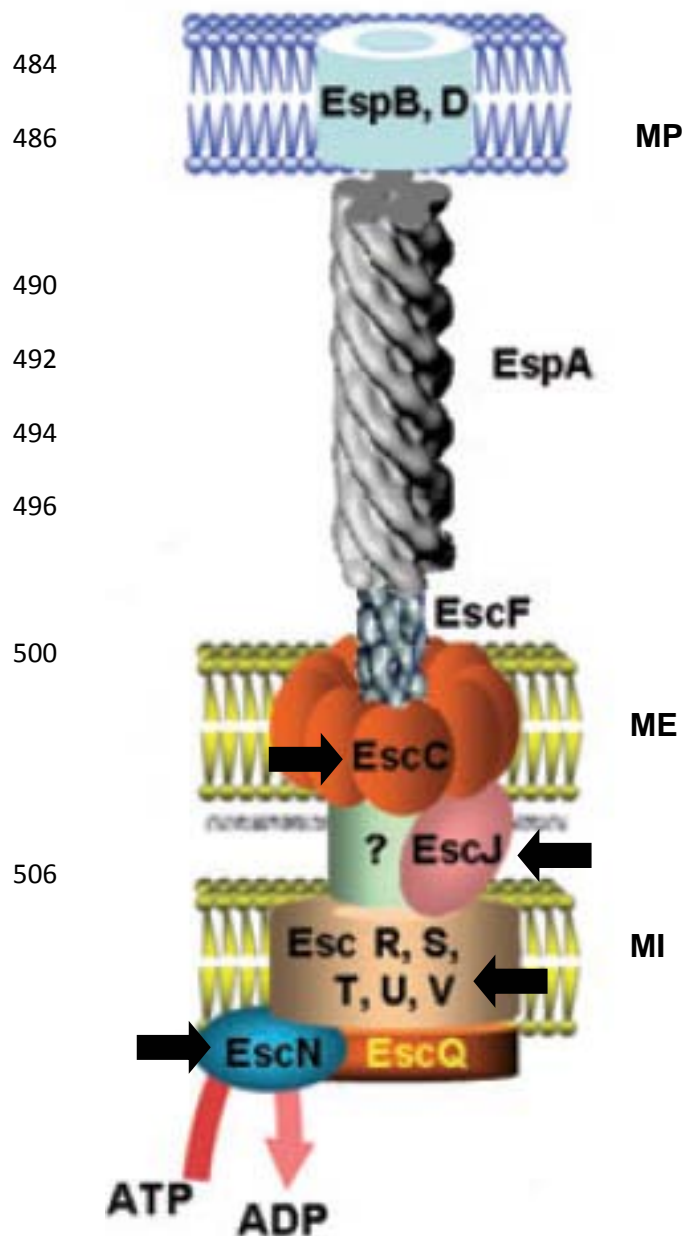
471 **Tabela 2.** Tamanho em pares de bases dos fragmentos amplificados por
 472 PCR *in silico* utilizando o programa pDRAW32.

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores	K-12	EHEC 12009	EHEC EDL933	EPEC E2348/69
<i>escC</i>	C1 C2	-	-	447	447
<i>escJ</i>	J1 J2	-	335	335	335
<i>escN</i>	N1 N2	-	854	854	854
<i>escV</i>	V1 V2	-	-	756	756
<i>escV</i>	III System	-	155	155	155

473 **Tabela 3.** Comparação entre as sequências de DNA dos oligonucleotídeos
 474 iniciadores e as correspondentes sequências genômicas dos genes
 475 estudados nas diferentes cepas de *E. coli*.

Cepa	Gene	Sequência de DNA ¹
EPEC E2348/69	<i>escC</i>	C1 GTCAGCGACAGATATAACATAC
		G GTCAGCGACAGATATAACATAC
		C2 AACGCATTACCCTAATC
	<i>escJ</i>	J1 AACGCATTACCCTAATC
		G CCAAAGAAATGGACAAAAGTGG
		J2 CCAAAGAAATGGACAAAAGTGG
	<i>escN</i>	G GACCGATGGTGCTAAGTTAACC
		G GACCGATGGTGCTAAGTTAACC
		N1 CGCCTTTTACAAGATAGAAC
		G CGCCTTTTACAAGATAGAAC
		N2 CATCAAGAATAGAGCGGAC
		G CATCAAGAATAGAGCGGAC
		V1 CTAACTTCTTTCCCACAATC
		G CTAACTTCTTTCCCACAATC
		V2 TATCCCAACAGGCAAAC
<i>escV</i>	G TATCCCAACAGGCAAAC	
	III S f TTTTCCCTTGATGGTATGCC	
	G TTTTCCCTTGATGGTATGCC	
	III S r TTTACAAACTTCATCGCCCC	
	G TTTACAAACTTCATCGCCCC	
	G TTTACAAACTTCATCGCCCC	
EHEC EDL933	<i>escC</i>	C1 GTCAGCGACAGATATAACATAC
		G GTCAGCGACAGATATAACATAC
		C2 AACGCATTACCCTAATC
	<i>escJ</i>	J1 AACGCATTACCCTAATC
		G CCAAAGAAATGGACAAAAGTGG
		J2 CCAAAGAAATGGACAAAAGTGG
	<i>escN</i>	G GACCGATGGTGCTAAGTTAACC
		G GACCGATGGTGCTAAGTTAACC
		N1 CGCCTTTTACAAGATAGAAC
		G CGCCTTTTACAAGATAGAAC
		N2 CATCAAGAATAGAGCGGAC
		G CATCAAGAATAGAGCGGAC
		V1 CTAACTTCTTTCCCACAATC
		G CTAACTTCTTTCCCACAATC
		V2 TATCCCAACAGGCAAAC
<i>escV</i>	G TATCCCAACAGGCAAAC	
	III S f TTTTCCCTTGATGGTATGCC	
	G TTTTCCCTTGATGGTATGCC	
	III S r TTTACAAACTTCATCGCCCC	
	G TTTACAAACTTCATCGCCCC	
	G TTTACAAACTTCATCGCCCC	
EHEC 12009	<i>escC</i>	C1 GTCAGCGACAGATATAACATAC
		G ATCAGCGACAGATATAACG TAT
		C2 AACGCATTACCCTAATC
	<i>escJ</i>	J1 AACGCATTACT CTG ATC
		G CCAAAGAAATGGACAAAAGTGG
		J2 CTAAGAAATGGACAAAAGTGG
	<i>escN</i>	G GACCGATGGTGCTAAGTTAACC
		G GACTGATGGTGCTAAGTTAACC
		N1 CGCCTTTTACAAGATAGAAC
		G CGCCTTTTACAAGATAGAAC
		N2 CATCAAGAATAGAGCGGAC
		G CATCAAGAATAGAGCGGAC
		V1 CTAACTTCTTTCCCACAATC
		G CTAACTTCTTT CCT ACAATC
		V2 TATCCCAACAGGCAAAC
<i>escV</i>	G GATACCAACAGGCAAAC	
	III S f TTTTCCCTTGATGGTATGCC	
	G TTTTCTCTTGATGGTATGCC	
	III S r TTTACAAACTTCATCGCCCC	
	G TTTACAAACTTCATCGCCCC	
	G TTTACAAACTTCATCGCCCC	

476 ¹ **C1:** oligonucleotídeo iniciador para *escC*; **G:** sequência genômica correspondente; **C2:** oligonucleotídeo iniciador
 477 para *escC*; **J1:** oligonucleotídeo iniciador para *escJ*; **J2:** oligonucleotídeo iniciador para *escJ*; **N1:** oligonucleotídeo
 478 iniciador para *escN*; **N2:** oligonucleotídeo iniciador para *escN*; **V1:** oligonucleotídeo iniciador para *escV*; **V2:**
 479 oligonucleotídeo iniciador para *escV*; **III S f:** oligonucleotídeo iniciador para *escV*; **III S r:** oligonucleotídeo iniciador
 480 para *escV*. Os nucleotídeos mal-pareados estão indicados em vermelho.



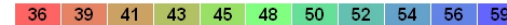
517 **Figura 1.** Representação esquemática do T3SS de *E. coli*, mostrando as
 518 proteínas conservadas. As setas indicam as proteínas cujos genes foram
 519 investigados neste trabalho. (Modificado de Tampakaki e colaboradores,
 520 2004 (28)). MP: membrana plasmática da célula eucariótica; ME: membrana
 521 externa bacteriana; MI: membrana interna bacteriana.

522 **A**



APEC O1
5082025 bp

GC% in 12705 bp blocks

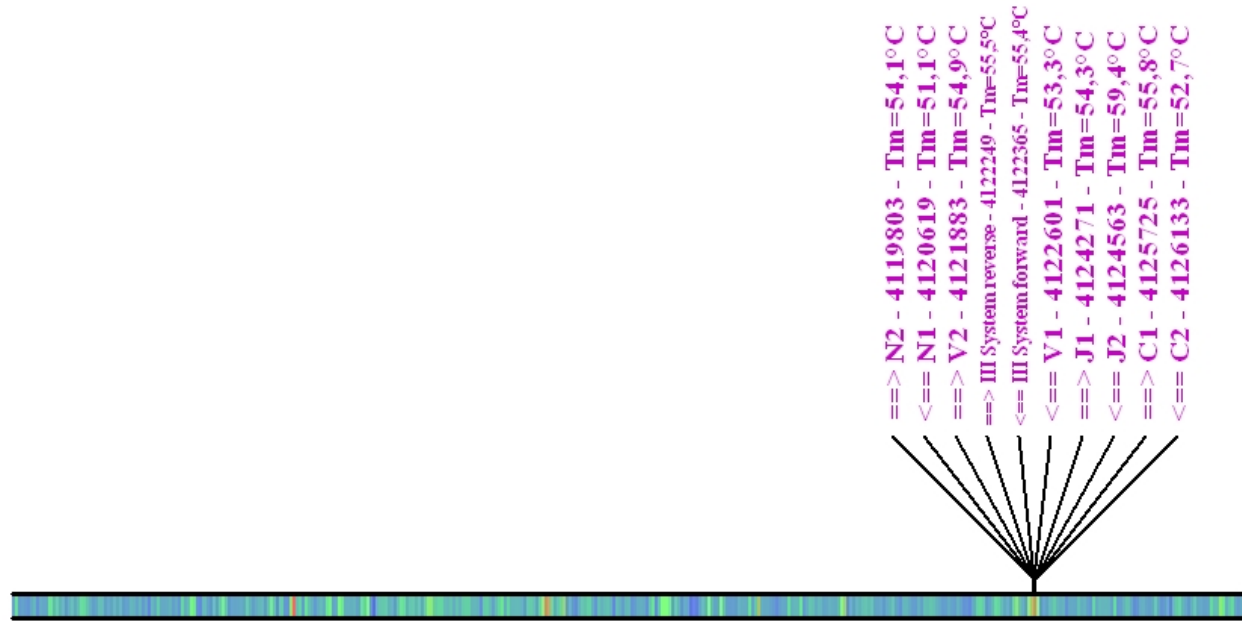


523

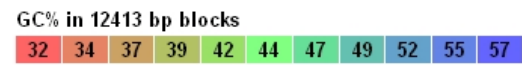
524

525 **Figura 2.** Anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores nos genomas. A) APEC O1. B) EPEC E2348/69. C) EHEC 12009.

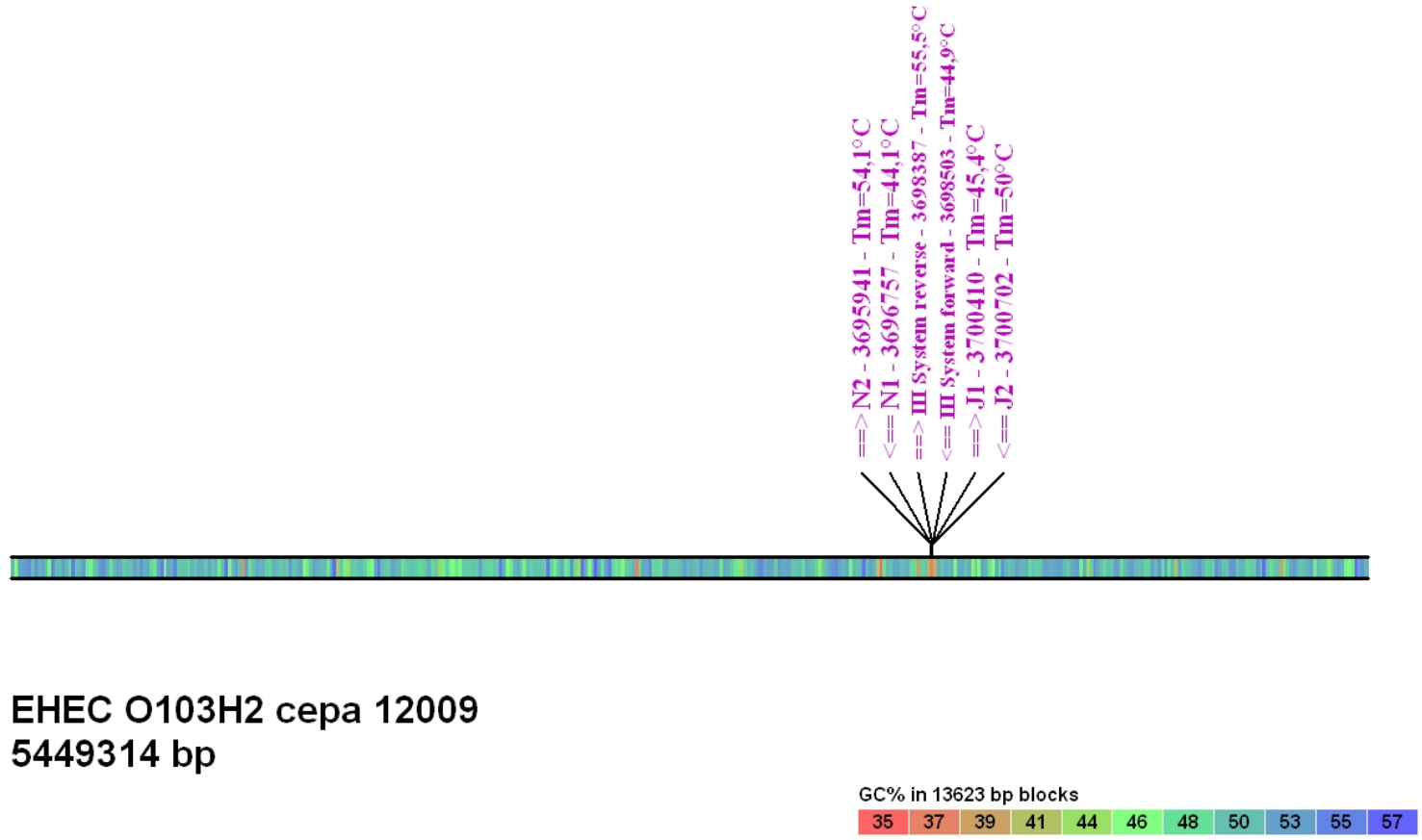
526 D) EHEC EDL933.



EPEC O127H6 str E234869
4965553 bp

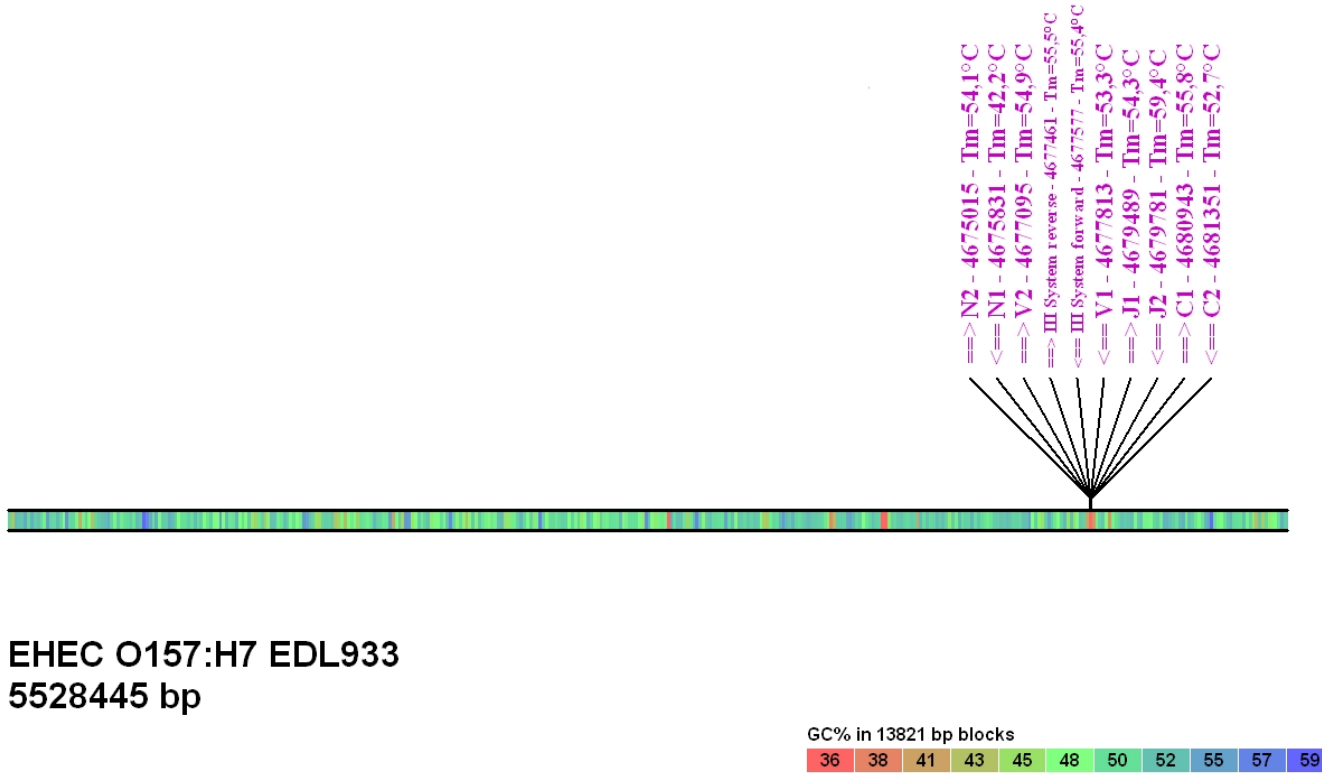


529 C

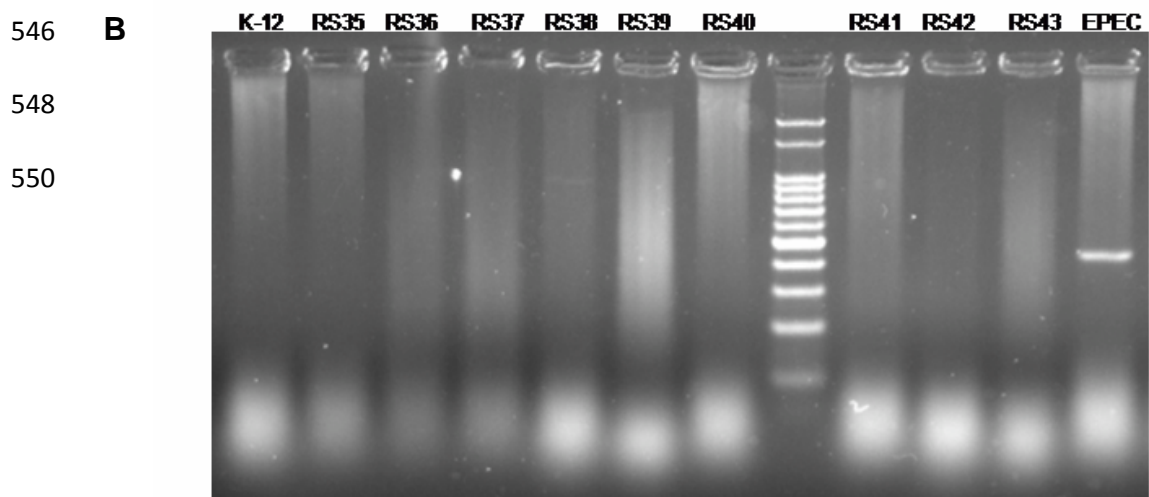
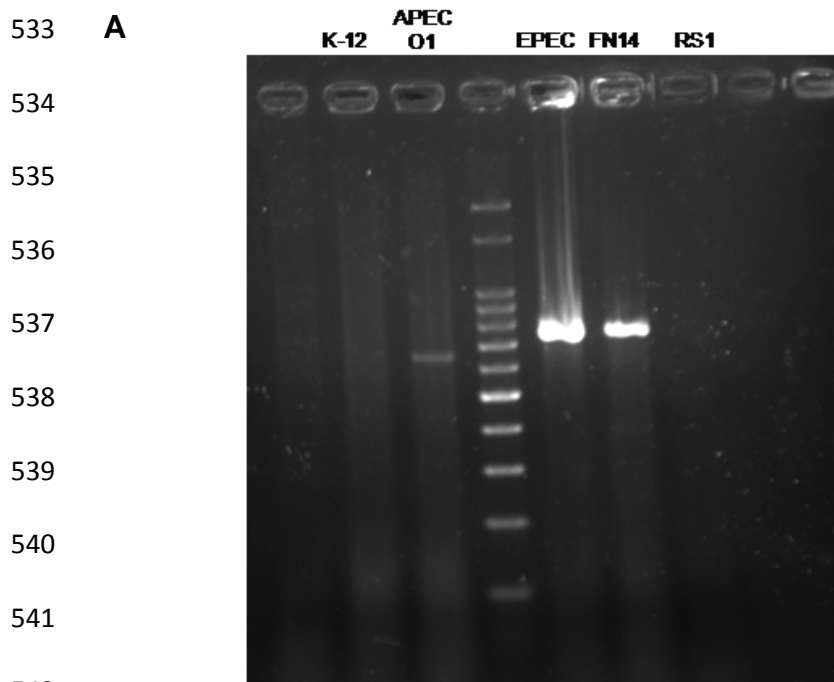


530

531 **D**



532



551 **Figura 3.** Produtos de amplificação por PCR. A) Fragmento do gene *escV*
 552 (758 pb) presente na cepa FN14 e no controle positivo EPEC. B) Fragmento
 553 do gene *escC* (449 pb) presente no controle positivo EPEC e ausente nas
 554 cepas APEC do Rio Grande do Sul. Marcador de peso molecular de 100 pb
 555 (Ludwig Biotec), a banda mais intensa representa 500 pb.