

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

ANÁLISE DA PRESENÇA DE GENES DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO 6 EM
CEPAS DE *Escherichia coli* patogênicas aviárias (APEC) ISOLADAS DE
COLISSEPTICEMIA EM FRANGOS DE CORTE DO RIO GRANDE DO SUL

Trabalho de Conclusão de Curso

ALINE LUÍSA DE OLIVEIRA

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISE DA PRESENÇA DE GENES DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO 6 EM
CEPAS DE *Escherichia coli* patogênicas aviárias (APEC) ISOLADAS DE
COLISSEPTICEMIA EM FRANGOS DE CORTE DO RIO GRANDE DO SUL

ALINE LUÍSA DE OLIVEIRA

Orientação: Prof^a Dr^a Fabiana Horn

Co-orientação: Nicolle Lima Barbieri

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

Porto Alegre, 2011

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

Dedico este trabalho, com todo o meu amor, à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã, Paula.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, o meu amor incondicional, a pessoa que eu mais admiro e que sempre fez tudo de melhor por mim;

Ao meu pai, que amo muito, por sempre ter feito por mim tudo o que estava ao seu alcance;

À minha irmã Paula, que amo muito, minha companheira de quase todas as horas, pela nossa história juntas;

Às minhas irmãs Jade e Aninha, por fazerem parte da minha história;

À minha “dinda”, Andréa, pelo carinho e apoio nos últimos meses, pelos pães e cafés nos fins de semana em Lajeado;

Aos meus avôs paternos e maternos, por todo o carinho e cuidado;

Ao Diego e ao Rodrigo, pela baita força que me deram e que foi de extrema importância para tornar mais fácil o início desta “jornada”;

Ainda ao Diego, pela amizade e por ter estado comigo em momentos de muitas risadas e também naqueles momentos em que rir é quase impossível;

À minha amiga Mariane, pela amizade de uma vida, por todas as “histórias pra contar”, pelas conversas, mesmo à distância;

À minha colega e amiga Michelle, pela parceria durante toda a faculdade, pelos vários dias de muitas horas de estudo e por sempre ter algo de bom a dizer;

Aos meus colegas de laboratório:

Nicolle, minha (grande) co-orientadora, por todo o apoio técnico e científico, por ter me compreendido e confortado nos momentos difíceis e por ter tornado mais divertidos vários dos meus dias;

Daniel, pela amizade e companheirismo (inclusive na hora do “lanche”), por ter contribuído várias vezes para que os meus dias fossem melhores;

Roberta, Letícia e Débora, pelo apoio técnico, pelas conversas e conselhos, pelos momentos agradáveis que compartilhamos;

À Fabiana, minha orientadora, pelo apoio científico, por ter me permitido fazer parte do grupo e desenvolver esse projeto;

Às gurias do LACEN:

Mara, Jane, Rosane, Simone e Solange - que fizeram do meu estágio uma experiência mais agradável do que eu poderia imaginar;

Filó, Georgina e Verinha (pela companhia e pelas conversas durante os “cafés”);

Ao Rodrigo, funcionário da ComgradBIO, pela paciência e competência ao me ajudar a resolver as questões burocráticas do fim da faculdade.

Àqueles professores que honram o título e que se dedicam à tarefa de ensinar, independentemente das dificuldades que possam existir, fazendo a diferença na formação dos seus alunos.

Ao professor Wanderley Dias da Silveira, cujo trabalho deu subsídios à realização deste projeto, através de informações essenciais para o seu desenvolvimento;

Aos professores Charley Staats e Vlademir Cantarelli, por aceitarem empregar parte do seu tempo na leitura e avaliação deste trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma com o meu desenvolvimento e me inspiraram a fazer sempre o melhor de que sou capaz, independentemente do propósito.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
1.1	A importância da avicultura na economia brasileira.....	8
1.2	A colibacilose aviária.....	8
1.3	<i>Escherichia coli</i>	10
1.4	<i>Escherichia coli</i> patogênica avária (APEC).....	11
1.5	Fatores associados à virulência.....	11
1.5.1	Adesinas.....	12
1.5.2	Invasinas.....	12
1.5.3	Resistência ao soro.....	13
1.5.4	Fatores de aquisição de ferro.....	13
1.5.5	Toxinas.....	14
1.6	O Sistema de Secreção do Tipo 6.....	15
	Esquema Representativo do T6SS.....	18
2	JUSTIFICATIVA.....	20
3	OBJETIVO.....	21
4	Material e Métodos.....	22
4.1	Isolados testados.....	22
4.2	Extração do DNA bacteriano.....	22
4.3	Oligonucleotídeos iniciadores.....	22
4.4	Análises <i>in silico</i> e desenho dos oligonucleotídeos iniciadores T6SS2.....	23
4.5	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	24
4.6	Eletroforese em gel de agarose.....	25
5	RESULTADOS.....	26
5.1	Análise <i>in silico</i> do T6SS1.....	26
5.2	Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores T6SS2.....	26
5.3	Análise <i>in silico</i> do T6SS2.....	27
5.4	Genotipagem das amostras.....	33
6	DISCUSSÃO.....	37
7	REFERÊNCIAS.....	39

RESUMO

A indústria avícola apresenta grande importância na economia brasileira, sendo que o Brasil é o maior exportador e o terceiro maior produtor mundial de carne de frango. No entanto, alguns fatores diminuem a produtividade da indústria avícola. Entre esses fatores estão as infecções extra-intestinais causadas por *Escherichia coli* patogênicas aviárias (APEC), que podem afetar aves domésticas e selvagens. A colissepticemia, infecção generalizada causada por *E. coli*, geralmente inicia no trato respiratório superior, culminando com a morte da ave. Os fatores de virulência mais associados a APEC incluem adesinas, invasinas, fatores de resistência ao soro, sistemas de aquisição de ferro e toxinas. Além desses fatores, maquinarias denominadas de Sistemas de Secreção podem influenciar a patogenicidade de uma bactéria. Os componentes desses sistemas medeiam o transporte de proteínas efetoras através da membrana interna, do espaço periplasmático e da membrana externa da bactéria, e a compreensão do seu funcionamento é importante para o entendimento da interação patógeno-hospedeiro. Esse trabalho teve como objetivo verificar a presença de quatro genes componentes do Sistema de Secreção do Tipo 6 (T6SS) em 48 isolados APEC. O T6SS, descrito em *Vibrio cholerae*, apresenta um operon composto por 15 a 20 genes. Neste trabalho, foi investigada a presença dos genes *clpV*, *hcp*, *vgrG* e dos homólogos de *icmF* (presente no Sistema de Secreção do Tipo IV, descrito em *Legionella pneumophila*). A genotipagem das amostras com relação a esses genes foi realizada através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) Multiplex, utilizando-se dois conjuntos distintos de oligonucleotídeos, e os resultados das reações foram verificados por eletroforese em gel de agarose e tiveram como controles positivos as cepas APEC MT78 (AY395687) e APEC01 (NC_008563.1). Alguns dos isolados genotipados apresentaram os quatro genes investigados, o que aponta para a provável presença do T6SS, podendo esse ser um fator associado à virulência dessas cepas.

Palavras-chave: APEC, Colissepticemia, *Escherichia coli*, Patogenicidade, Sistema de Secreção do tipo VI.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A importância da avicultura na economia brasileira

Atualmente o Brasil é o maior exportador mundial e o terceiro maior produtor de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos e da China. A produção brasileira de carne de frango alcançou 12,2 milhões de toneladas em 2010, sendo os estados da região Sul responsáveis por mais da metade da produção nacional e por 75% da exportação. Da produção avícola total do país no último ano, 69% foi destinada ao consumo interno, e 31% (3,819 milhões de toneladas), à exportação. O preço médio das vendas brasileiras foi de US\$ 1.782 por tonelada, resultando em uma receita cambial de US\$ 6,808 milhões (UBA, Relatório Anual 2010/2011). Dessa forma, a indústria avícola é de grande importância para a economia interna e balança comercial do país, gerando alimentos de alto valor proteico com relativo baixo custo. No entanto, alguns fatores podem causar uma diminuição significativa da produtividade na indústria avícola e, por conseguinte, um aumento de custo da produção. Entre eles, destacam-se as infecções extra-intestinais por *Escherichia coli* patogênicas aviárias (APEC), responsáveis por grandes perdas econômicas na avicultura brasileira. Os relatos de condenações por celulite aviária em agroindústrias no Brasil variam de 0,14% a 1,4% da produção (Fallavena *et al.*, 2000). Considerando-se a produção de 2010, as perdas seriam de pelo menos 24,6 mil toneladas de carne de frango (UBA, Relatório Anual 2010/2011).

1.2 A Colibacilose aviária

Infecções extra-intestinais causadas por *E. coli* em aves recebem o nome de colibacilose aviária. A doença manifesta-se na forma de infecção localizada ou sistêmica, sendo mais comum em galinhas, perus e patos, mas pode também ocorrer em outras espécies de aves, como gansos, pássaros domésticos e aves silvestres (Barnes & Gross, 1997; Dho-Moulin & Fairbrother., 1999; Barbieri, 2010).

Aves acometidas pela colibacilose podem desenvolver lesões em articulações, em tecidos subcutâneos e em diferentes órgãos, como fígado, coração, sacos aéreos e pulmões. Tais lesões podem levar à condenação da carcaça ou à disseminação da doença por toda a criação (Ferreira & Knöbl, 2000). A colibacilose contribui para a diminuição da qualidade da produção de aves comerciais por afetar todas as etapas dessa produção. A morbidade (com perda de peso e redução do crescimento e da produção de ovos), o aumento da condenação das carcaças durante o processamento e o aumento da mortalidade são responsáveis por perdas econômicas nesse setor (Barnes & Gross, 1997; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

As aves são afetadas pela colibacilose no período entre 4 a 8 semanas de idade, quando estão mais suscetíveis a problemas respiratórios. Quadros de salpingite (infecção no oviduto) e infecções sistêmicas são as manifestações da doença que geralmente estão relacionadas à infecção por *E. coli* em aves adultas (Ferreira & Knöbl, 2000; Cardoso et al., 2002). Os sintomas mais evidentes nas aves doentes são depressão e febre, que podem ser seguidos de morte (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

Colissepticemia é o nome dado à infecção sistêmica causada por *E. coli* (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). A doença geralmente inicia-se no trato respiratório superior e pode instalar-se em diferentes locais anatômicos da ave e apresentar sintomatologia variada (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Ngeleka et al., 1996). Diversos fatores ambientais podem tornar as aves mais suscetíveis à infecção por APEC, por oferecerem à bactéria um ambiente mais propício ao seu desenvolvimento. Entre eles estão: a alta concentração de amônia no ambiente (que pode causar danos no epitélio ciliar do trato respiratório, facilitando a entrada da bactéria); a deficiência no sistema de ventilação, a exposição a temperaturas extremas, a limitação do espaço para a criação e a deficiência do processo de desinfecção (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Ferreira & Knöbl, 2000).

Outras condições que podem predispor as aves à infecção são a existência de infecções por outros agentes - como *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus paragallinarum*, *Pneumovirus*, vírus da Bronquite Infeciosa, doença de Marek e de New Castle - e a presença de micotoxinas na ração. Ou seja, qualquer fator capaz de causar lesão no epitélio

respiratório, inclusive vacinas com vírus atenuado, pode tornar a ave mais suscetível à doença (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Ferreira & Knöbl, 2000; Dwars et al., 2009).

As lesões mais comumente causadas pela infecção por APEC são peri-hepatite, aerossaculite e pericardite, embora outras - como peritonites, salpingites, onfalites e osteomielite - possam ser observadas. A forma de manifestação da infecção depende dos fatores de virulência dos isolados e da suscetibilidade da ave (Dziva & Stevens, 2008).

1.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um microrganismo gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae. Descrita em 1885, por Theodor von Escherich, *E. coli* tem forma de bastonete curto, é anaeróbica facultativa e apresenta distribuição cosmopolita. Coloniza o trato intestinal da maioria dos animais logo após o seu nascimento, tornando-se um importante membro da microbiota (Barnes & Gross, 1997; Ferreira & Knöbl, 2000; Kaper et al., 2004).

E. coli foi considerada por muito tempo uma bactéria não-patogênica, responsável por auxiliar na prevenção da colonização do epitélio intestinal por microorganismos patogênicos. Entretanto, a aquisição de fatores de virulência por alguns clones de *E. coli* tornou-os capazes de causar diversas doenças em humanos e outros animais (Barnes & Gross, 1997; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Ferreira & Knöbl, 2000; Kaper et al., 2004). Esses fatores de virulência - encontrados em elementos genéticos, como plasmídeos, transposons, ilhas de patogenicidade e bacteriófagos - devem permitir (1) a adaptação e colonização de novos nichos no hospedeiro; (2) a sobrevivência e a multiplicação da bactéria no hospedeiro; (3) o escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro; e, finalmente, (4) a saída da bactéria para e sua transmissão para um novo hospedeiro suscetível (Falkow, 1991).

De acordo com a presença de genes de virulência, com a sintomatologia clínica ou o local de onde foram isoladas, as cepas *E. coli* podem ser classificadas como: (1) comensais, quando presentes na microbiota normal de humanos, mamíferos e aves saudáveis, sem causar dano ao seu hospedeiro; ou (2)

patogênicas: causadoras de gastroenterites e colites, quando ingeridas em quantidades suficientes, ou de infecções extra-intestinais (Russo & Johnson, 2000).

E. coli patogênicas são classificadas em dois grupos: (1) InPEC (*Intestinal Pathogenic E. coli*), responsáveis pelas diarreias, podendo apresentar diversas estratégias para invadir as células intestinais (Klemm et al., 2010; Reis & Horn, 2010); e (2) ExPEC (*Extraintestinal Pathogenic E. coli*). O último grupo é dividido em três subgrupos: UPEC (*UroPathogenic E. coli*), causadoras de infecção do trato urinário; NMEC (*Newborn Meningitis-causing E. coli*), causadoras de meningite no neonato; e APEC (*Avian Pathogenic E. coli*), causadoras da colibacilose em aves (Kaper et al., 2004).

1.4 *Escherichia coli* patogênicas aviárias (APEC)

APEC são o agente etiológico da colibacilose aviária, doença disseminada por todo o mundo (Ferreira & Knöbl, 2000). Podem estar presentes na microbiota intestinal de aves saudáveis e, dessa forma, permanecer nas criações por um longo período, levando à contaminação dos alimentos e da água, fazendo com que esses sirvam de via de disseminação da bactéria entre as aves (Ewers et al., 2009). Acredita-se que uma das formas de transmissão da doença para os pintos seja a contaminação fecal da casca do ovo.

Atualmente, a doença é diagnosticada a partir do isolamento de *E. coli* de lesões presumivelmente de colibacilose (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). Após o isolamento, realizado em meio apropriado, como o ágar MacConkey - seletivo para gram-negativas – é feita a confirmação da identidade das cepas através dos testes bioquímicos (Barnes & Gross, 1997; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Ferreira & Knöbl, 2000).

1.5 Fatores associados à virulência

Ainda não há um marcador do patótipo de APEC (Dzva & Stevens, 2008), ou seja, não está definido se existe um fator ou conjunto de fatores de virulência

imprescindível à infecção por essas cepas. No entanto, há diversos indicadores de patogenicidade descritos para elas, entre os quais estão as adesinas, invasinas, fatores de resistência ao soro, sistemas de aquisição de ferro, toxinas e outros (Barbieri, 2010). Abaixo, um breve relato dos fatores associados à virulência mais frequentemente investigados em isolados APEC.

1.5.1 Adesinas

As adesinas, responsáveis por mediar a aderência da bactéria ao hospedeiro (Kaper *et al.*, 2004), podem ser fimbriais ou afimbriais. As fímbrias são filamentos de proteínas ou apêndices expressos na superfície celular das bactérias (Dziva & Stevens, 2008). A fímbria mais comum em *E. coli* é a fímbria do tipo 1, que, por se ligar à D-manose, possibilita a ligação a várias células eucarióticas, entre elas as intestinais, pulmonares, de bexiga, epitélio renal e células inflamatórias. Em isolados APEC, a frequência da fímbria do tipo 1 é de 70 a 100 % (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Barbieri, 2010; Ewers *et al.*, 2007).

Outra fímbria é a fímbria P, codificada pelo operon *pap*. Em aves infectadas experimentalmente com cepas APEC, a expressão desta fímbria foi observada durante e colonização dos sacos aéreos, pulmões e órgãos internos (Pourbakhsh *et al.*, 1997 a; Pourbakhsh *et al.*, 1997 b). O gene *pap* apresenta uma frequência de 25 a 30 % nestas cepas, e a fímbria P não tem sido considerada essencial à patogênese (Barbieri, 2010; Ewers *et al.*, 2007; Stordeur *et al.*, 2002).

O Curli, presente em 100 % dos isolados APEC (Barbieri, 2010; Ewers *et al.*, 2007), é uma estrutura fina e enrolada, codificada pelo operon *csg* (Klemm *et al.*, 2010).

Entre as adesinas afimbriadas estão Tsh (temperature-sensitive haemagglutinin), que contribui para a colonização dos sacos aéreos (Dozois *et al.*, 2000). Isolados de APEC, diferentemente de outras ExPEC, apresentam alta frequência de Tsh (50-70 %; Barbieri, 2010; Ewers *et al.*, 2007).

1.5.2 Invasinas

As invasinas são responsáveis por mediar a invasão de células eucarióticas, possibilitando à bactéria manter-se no interior do hospedeiro sem sofrer os efeitos do soro. São exemplos de invasinas a proteína IbeA e o homólogo da proteína Tia, além da ilha de patogenicidade *gimB*. IbeA está presente em aproximadamente 13% dos isolados APEC (Barbieri, 2010; Ewers *et al.*, 2007), e suas funções são, provavelmente, auxiliar na colonização do epitélio pulmonar (Germon *et al.*, 2005; Cortes *et al.*, 2008) e, em NMEC, na invasão da barreira hemato-encefálica (Kim, 2001). A proteína Tia foi descrita na *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), na qual desempenha papel de aderência e invasão de células humanas íleo-cecais e epiteliais colônicas em cultura (Fleckenstein, 1996). Em APEC, uma proteína homóloga à Tia, cujo gene está presente em uma ilha de patogenicidade de 56 kb, que também codifica outros fatores de virulência (Kariyawasam, 2006), está presente em cerca de 25 % dos isolados (Barbieri, 2010; Ewers *et al.*, 2007). A ilha de patogenicidade *gimB*, associada, em NMEC, à manutenção dos níveis de bacteremia característicos da meningite (Bonacorsi *et al.*, 2003), está presente em cerca de 10 % dos isolados APEC (Barbieri, 2010; Ewers *et al.*, 2007).

1.5.3 Resistência ao soro

Alguns fatores conferem às APEC resistência à ação do sistema complemento e à fagocitose mediada por opsonização, aumentando assim a virulência bacteriana (Nolan *et al.*, 2003). Um fator importante para a resistência ao soro é o plasmídeo colV, que codifica os genes *traT* e *iss* - que supostamente protegem a membrana bacteriana do ataque pelo sistema complemento (Dziva & Stevens, 2008) - além do gene da colicina V, uma substância antimicrobiana que pode estar envolvida no estabelecimento da infecção (Zhao *et al.*, 2009). Considerando os isolados APEC, o gene *traT* está presente em aproximadamente 80 %; *iss*, em 75 %, e *colV* em aproximadamente 46 % dos isolados (Barbieri, 2010).

A cápsula K1, associada a infecções extra-intestinais (Bliss *et al.*, 1996), apresenta propriedade anti-fagocítica (Van Dijk *et al.*, 1979) e pode estar envolvida na resistência ao soro (Stawski *et al.*, 1990), além de ser essencial para a penetração da barreira hemato-encefálica em NMEC (Kim *et al.*, 2008). OmpA, uma proteína de membrana externa, desempenha função de adesina, invasina, serve também como fator de resistência ao soro, e é sítio de reconhecimento de vários bacteriófagos (Smith *et al.*, 2007). Em APEC, o gene *neuC*, que codifica a cápsula K1, está presente em torno de 20-30 % dos isolados, enquanto que a frequência de *OmpA* é de aproximadamente 93 % (Barbieri, 2010).

1.5.4 Fatores de aquisição de ferro

Bactérias patogênicas são capazes de sequestrar ferro dos tecidos corporais, propriedade essencial para a virulência bacteriana devido à baixa concentração de ferro nos tecidos do hospedeiro. O sistema da aerobactina, o mais bem caracterizado entre os sideróforos (Vokes *et al.*, 1999), é composto pelo operon *iucABCD* e pelo gene *iut* (Dziva & Stevens, 2008; La Ragione *et al.*, 2002); *iucD*, um dos genes do operon, está presente em mais de 70 % dos isolados APEC (Barbieri, 2010).

A salmoquelina, outro fator de aquisição de ferro, também encontrado em plasmídeos ColV (Johnson *et al.*, 2006), é codificada pelo operon *iroBCDEN*. A expressão de IroN, uma das proteínas desse sistema, é regulada de acordo com a presença de ferro no meio (Sorsa *et al.*, 2003), e esse gene está presente em aproximadamente 37 % das APEC. De acordo com Caza *et al.*, para que um isolado APEC seja virulento, é necessária a presença de pelo menos um destes sistemas de aquisição de ferro, sendo que a presença dos dois sistemas torna a cepa mais virulenta do que a presença de apenas um deles (Caza *et al.*, 2008).

Além desses dois sideróforos, podem estar presentes em APEC: o sistema transportador de ferro codificado pelo operon *sitABCD* - composto por permeases que aumentam a captura de ferro e manganês e contribuem para a multiplicação bacteriana (Sabri *et al.*, 2008); o gene *ireA*, associado à captação de ferro e ao aumento da invasão em bexiga de camundongos (Russo *et al.*, 2001); o gene *chuA*,

um receptor e utilizador de ferro heme (Li *et al.*, 2005). A frequência de *ireA* em APEC é cerca de 70 %, e a de *chuA* é maior do que 60 % (Barbieri, 2010).

1.5.5 Toxinas

Entre as toxinas mais frequentemente produzidas por APEC estão as proteínas Vat (toxina autotransportadora vacuolizante), que apresenta um efeito citotóxico formando vacúolos na célula do hospedeiro (Parreira & Giles, 2003), e EAST1, codificada pelo gene *astA*. Em isolados APEC, a frequência de Vat é de aproximadamente 18 %, e a frequência de *astA*, 33 % (Barbieri, 2010).

1.6 O Sistema de Secreção do Tipo 6

Além desses fatores associados à virulência, maquinarias denominadas Sistemas de Secreção podem influenciar a patogenicidade de uma bactéria (Kostakioti *et al.*, 2005). Esses sistemas apresentam componentes que medeiam o transporte de proteínas efetoras através da membrana interna, do espaço periplasmático e da membrana externa da bactéria (Shrivastava & Mande, 2008).

A elucidação dos mecanismos utilizados pelas bactérias para a secreção de proteínas é importante na compreensão da associação patógeno-hospedeiro, já que muitas das proteínas secretadas estão associadas à virulência da bactéria (Shrivastava *et al.*, 2008).

Existem seis sistemas de secreção, do 1 ao 6, descritos para bactérias gram-negativas. Os sistemas de secreção dos tipos 2 e 5 são sec-dependentes, ou seja, secretam as proteínas bacterianas ao meio extracelular após estas terem sido transladadas ao espaço periplasmático pelos sistemas Sec e Tat. Já os sistemas de secreção dos tipos 1, 3, 4 e 6 secretam proteínas bacterianas através das membranas interna e externa da bactéria e possuem aparatos para injetar as proteínas diretamente no citosol da célula do hospedeiro (Tseng *et al.*, 2009).

O Sistema de Secreção do Tipo 6 foi descrito em 2005 (Pukatzki *et al.*, 2005), quando se estudou uma cepa de *Vibrio cholerae* responsável por um surto de cólera

ocorrido no Sudão, em 1968. As cepas causadoras de pandemias de cólera são geralmente pertencentes aos sorogrupos O1 e O139. Porém, nesse caso, a cepa pertencia ao sorogrupo O37, não conhecido por causar pandemias.

Diferentemente de outras cepas de *V. cholerae*, esta apresentou resistência à predação por *Dictyostelium discoideum*, e verificou-se que esse fenótipo era consequência de um sistema de secreção até então desconhecido. Esse sistema foi denominado de sistema de secreção do tipo 6, por ser distinto dos cinco sistemas descritos até então.

O T6SS apresenta um operon composto por 15 a 20 genes, e, a partir da análise de genomas bacterianos, foi identificado um grupo de 13 proteínas conservadas que constitui o núcleo do T6SS (Shrivastava & Mande, 2008), e um conjunto de proteínas não conservadas, responsáveis por funções regulatórias e acessórias (Bingle *et al.*, 2008).

Diversos estudos acerca do T6SS já foram realizados. Porém, as funções exatas dos genes que compõem este sistema ainda não foram elucidadas. Acredita-se que as proteínas que não são secretadas podem compor estruturalmente o aparato de secreção e/ou auxiliar no transporte de proteínas de alguma outra forma, atuando, por exemplo, no fornecimento da energia necessária ao transporte dos substratos pelo sistema (Filloux *et al.*, 2008).

Até o momento, quatro genes componentes do T6SS foram parcialmente caracterizados. São eles: *clpV*, *hcp*, *vgrG* (todos codificadores de proteínas estruturais e secretadas) e um conjunto de genes homólogos ao *icmF* de *Legionella pneumophila* (Bingle *et al.*, 2008; Filloux *et al.*, 2008; Cascales, 2008).

O gene *clpV* (*caseinolytic protease V*) pertence a uma superfamília de ATPases responsáveis pela energização da formação de um canal hexamérico, através do qual as proteínas são transportadas em um mecanismo dependente de hidrólise de ATP (Bingle *et al.*, 2008; Cascales, 2008). É membro da família Hsp100/clp, que abrange proteínas responsáveis por desagregar, degradar e redobrar proteínas agregadas ou malformadas. Apresenta as funções de transporte e redobrimento de proteínas, mas não parece ser capaz de realizar a função de desagregação de proteínas (Bingle *et al.*, 2008; Filloux *et al.*, 2008; Cascales, 2008; Schlieker, 2005).

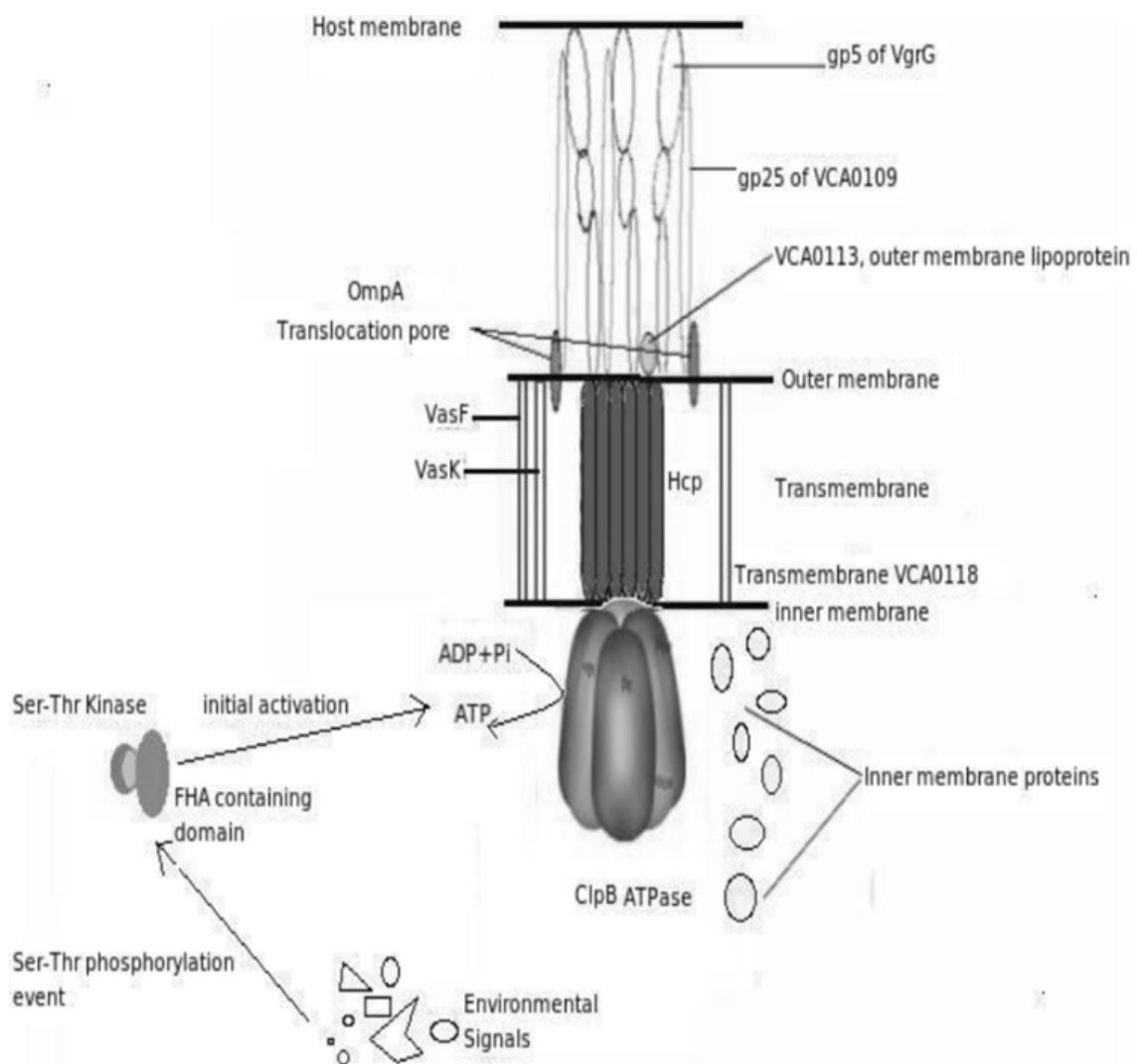
Hcp (*hemolysin coregulated protein*) é uma proteína que forma anéis hexaméricos que se sobrepõem para dar origem ao tubo transmembrana, através do qual as proteínas são secretadas. A proteína VgrG (*valine-glycine repeat protein*), por sua vez, forma uma estrutura pontiaguda localizada na extremidade superior do tubo formado por hcp, e que, supostamente, perfuraria a célula hospedeira para a secreção das proteínas bacterianas efetoras no interior da mesma (Bingle *et al.*, 2008; Filloux *et al.*, 2008; Cascales, 2008).

Os genes homólogos ao *icmF* (*intracellular multiplication F*), essenciais para a replicação intracelular em várias linhagens bacterianas, contêm vários domínios transmembrana (Bingle *et al.*, 2008; Sexton *et al.*, 2004). IcmF seria uma proteína transmembrana que, supostamente, interagiria com a parte citosólica e com a ATPase ClpV do T6SS (Cascales, 2008).

A relação entre T6SS e virulência de uma cepa APEC foi estabelecida recentemente por Pace *et al.* (Pace *et al.*, 2010), que verificaram que a cepa APEC SEPT 362, isolada do fígado de um frango com sinais de septicemia, expressava um Sistema de Secreção do Tipo 6. Nesse trabalho, verificou-se, através da criação de mutantes para os componentes do T6SS, a contribuição do T6SS para a virulência *in vivo* de SEPT 362. Além disso, mutantes para *hcp* e *clpV* tiveram suas capacidades de adesão e de rearranjo do citoesqueleto de células epiteliais diminuídas, e o mutante *hcp* apresentou pequena diminuição na capacidade de invasão de células epiteliais. O comprometimento dessas características, de acordo com os autores do trabalho, pode ser devido à diminuição da expressão da fímbria do tipo 1 observada nesses mutantes.

O mesmo grupo mostrou a relação de outro gene do T6SS, o *icmF*, com a patogênese de SEPT 362 (Pace *et al.*, 2011). Nesse trabalho, o mutante para *icmF* demonstrou diminuição da adesão a células HeLa, assim como observado para os mutantes *hcp* e *clpV*. Porém, nesse caso, o mutante não apresentou diminuição na expressão de *fimA*, tampouco na virulência *in vivo*, sugerindo que a contribuição de *icmF* para a adesão é independente da fímbria. Além disso, *icmF*, assim como *hcp*, mostrou contribuição importante para o fenótipo invasivo da cepa SEPT 362, visto que os mutantes para *icmF* tiveram a capacidade de invasão comprometida. Ainda no mesmo trabalho, os autores verificaram que o mutante *icmF* apresentou

capacidade de formação de biofilmes e viabilidade no interior de macrófagos diminuída.



Esquema representativo de um Sistema de Secreção do Tipo 6.

Fonte: Shrivastava & Mande, 2008.

2. JUSTIFICATIVA

Embora o Sistema de Secreção Tipo 6 tenha sido descrito recentemente em *Vibrio cholerae* (48), a presença de genes componentes desse sistema tem sido detectada em diversos microrganismos, incluindo várias linhagens de *Escherichia coli* e algumas espécies de outros gêneros, relacionados evolutivamente ou não (46). Entre as linhagens de *E. coli* positivas para os genes do T6SS estão as cepas patogênicas aviárias APEC O1 e MT78, esta uma cepa sabidamente invasiva.

Além disso, mais recentemente, foi demonstrada a influência do T6SS sobre a virulência da cepa SEPT 362, isolada de um frango com colissepticemia. Nessa cepa, a deleção dos genes componentes do T6SS levou a uma diminuição da virulência (54, 55). Entretanto, ainda são poucos os estudos que investigam a possível relação do T6SS com a virulência de uma cepa bacteriana.

Diante desse panorama, considerou-se importante investigar a presença do T6SS nas cepas de *E. coli* patogênicas aviárias que constituem a nossa coleção.

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é investigar a presença de quatro genes (*clpV*, *hcp*, *vgrG* e *icmF*) componentes do Sistema de Secreção do Tipo 6 em isolados APEC (Avian Pathogenic *E. coli*) oriundos de colissepticemia em frangos de corte provenientes do Rio Grande do Sul.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados testados

Neste trabalho, foram analisados, quanto à presença de genes do sistema de secreção do tipo 6, 48 isolados APEC obtidos de frangos de corte com colissepticemia, provenientes de abatedouros de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul.

Os isolados foram obtidos de frangos com idade média de 7 semanas, recém-sacrificados, a partir da carcaça e de diferentes órgãos, como sacos aéreos, coração, fígado e intestino. As amostras foram cedidas pelo Dr. Benito de Guimarães Brito do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor.

As cepas foram mantidas em estoques em caldo Lúria Bertani (LB), com 20 % de glicerol, e armazenadas a -80°C.

4.2 Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA das cepas bacterianas foi realizada através do método de simples fervura: 3 a 4 colônias bacterianas foram ressuspensas em 200 µL de água mili-Q; a suspensão foi resfriada a -20 °C por 10 minutos e, em seguida, incubada em banho a 100 °C por 10 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 14000 *g* por 10 minutos e, então, armazenadas a 4 °C, para serem usadas posteriormente na reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.3 Oligonucleotídeos iniciadores

Neste trabalho, utilizaram-se dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores para investigação da presença dos genes *icmF*, *clpV*, *hcp* e *vgrG*, componentes do

Sistema de Secreção do Tipo 6, nas cepas APEC. Um deles, referido aqui como T6SS1, foi desenhado por Pace *et. al.* (54), baseado na seqüência dos genes do T6SS da *E. coli* entero-hemorrágica EHEC 86-24; e o outro, aqui referido como T6SS2, desenhado em nosso laboratório baseado nas seqüências dos genes da cepa APEC O1 (NC_008563.1) e da ilha de patogenicidade (AY395687) presente na cepa BEN 2908.

4.4 Análises *in silico* e desenho dos oligonucleotídeos iniciadores T6SS2

Inicialmente, realizou-se uma busca no banco de dados do “Genome Project”, no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>) das seqüências dos genes *icmF*, *clpV*, *hcp* e *vgrG* no genoma da cepa APEC O1 (NC_008563.1) e na ilha de patogenicidade (AY395687) da cepa BEN 2908, que apresentam os genes do T6SS investigados neste trabalho. Foram obtidas também as seqüências destes genes para outras cepas de *E. coli*, como a entero-hemorrágica EHEC 0157H7 Sakai, cepa utilizada como modelo para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores do conjunto T6SS1, e as uropatogênicas (UPEC CFT073 e UPEC UTI189, não utilizadas nas análises).

Obtidas essas seqüências, realizou-se através do programa pDRAW, uma PCR *in silico*, para verificar se os oligonucleotídeos iniciadores T6SS1 anelariam nas seqüências dos genes do T6SS de APEC O1 e BEN 2908, amplificando os fragmentos de interesse.

Após tal análise, optou-se por desenhar um novo conjunto de oligonucleotídeos iniciadores, sendo usadas como molde as seqüências dos genes das cepas APEC e BEN 2908. Para isso, utilizou-se o programa Prime3. Após, testou-se a identidade desses oligonucleotídeos iniciadores, através do BLAST (Basic Local Alignment search Tool), selecionando-se seqüências genômicas de *E. coli*, para verificar se eram específicos para a amplificação de genes nessas seqüências.

Após desenhados os oligonucleotídeos iniciadores T6SS2, realizou-se a PCR *in silico*, da mesma forma que a realizada para o conjunto T6SS1, para verificar se ocorreria o anelamento das seqüências desenhadas nas seqüências de interesse

das cepas. Além de verificar o anelamento às sequências de interesse, o programa fornece o tamanho do fragmento, em pares de bases, a ser amplificado e a temperatura de anelamento do oligonucleotídeo iniciador ao DNA molde.

4.5 Reação em Cadeia da Polimerase

Após definidos os novos oligonucleotídeos iniciadores, foram feitos testes para serem definidas as concentrações de cada componente do *mix* de reação e as condições da PCR.

A genotipagem dos isolados para os oito pares de oligonucleotídeos iniciadores foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Todas as reações foram preparadas para um volume final de 25 μ L (em água Milli-Q), contendo 2,5 μ L de tampão de PCR 10 X, 2,0 μ L de 50 mM $MgCl_2$, 2 U Taq DNA-polimerase (CBIOT), 0,5 μ L de cada dNTP 10 mM, 0,1 μ L (10 pmol) do par de oligonucleotídeos iniciadores e 4 μ L do DNA de cada cepa.

Para conjunto de oligonucleotídeos T6SS1, as reações ocorreram sob as seguintes condições, em um termociclador (PCR Sprint, Thermo): 2 minutos a 94 °C, 25 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C e 1 minuto a 68 °C, com um ciclo final de 7 minutos a 72 °C. Os amplicons foram mantidos a 4 °C até a realização da eletroforese. Pelo fato de três dos fragmentos amplificados apresentarem tamanhos semelhantes, foram feitos dois *mix* distintos: um para os genes *hcp* e *vgrG*; outro para os genes *icmF* e *clpV*.

Já para o conjunto T6SS2, as condições foram: 1 minuto a 94 °C, 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C e 1 minuto a 72 °C, com um ciclo final de 5 minutos a 72 °C. Nesse caso, como os fragmentos apresentavam tamanhos bem distintos, foi feita uma reação multiplex.

Como controle positivo para o T6SS1 foi utilizada a cepa SEPT 362, que de acordo com Pace *et al* 2010 apresenta os quatro genes investigados nesse trabalho. Para o T6SS2, os controles positivos utilizados foram as cepas APEC APEC O1 e MT78 (BEN 2908).

4.6 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das PCRs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5 %. O tamanho dos amplicons foi comparado com o marcador de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec).

5 RESULTADOS

5.1 Análise *in silico* do T6SS1

Através da busca dos genes do T6SS *icmF*, *clpV*, *hcp* e *vgrG* no banco de dados do Genoma Project NCBI, foi verificada a presença dos genes nas cepas APEC O1, BEN 2908, EHEC O157:H7 Sakai, além de várias outras cepas de *E. coli* não consideradas no desenvolvimento do trabalho. Essas sequências foram usadas nas análises *in silico* dos oligonucleotídeos iniciadores a serem testados neste trabalho.

A PCR *in silico*, realizada através do programa pDRAW32, para o T6SS1 detectou a presença de todos os genes pesquisados na *E. coli* EHEC O157H7 str. Sakai, utilizada como molde para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores do T6SS1. Já as cepas APEC O1 e BEN 2908 apresentaram anelamento *in silico* apenas dos oligonucleotídeos *clpV*rev e *vgrG*rev (Figura 1) O programa forneceu também o tamanho dos fragmentos a serem amplificados e a temperatura de anelamento das sequências ao DNA molde (Tabela 1).

Essa análise demonstrou que os oligonucleotídeos iniciadores T6SS1 não apresentavam sítios de anelamento suficientes nas sequências dessas cepas, sabidamente portadoras do T6SS, e que, portanto, não seriam capazes de amplificar os genes de interesse.

5.2 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores T6SS2

Pelo fato de o conjunto T6SS1 não se mostrar capaz de amplificar *in silico* os genes presentes nas cepas APEC O1 e BEN 2908, que apresentam os genes do T6SS no seu genoma (49), optou-se por desenhar um novo conjunto com base nessas cepas. Este segundo conjunto de oligonucleotídeos foi denominado T6SS2.

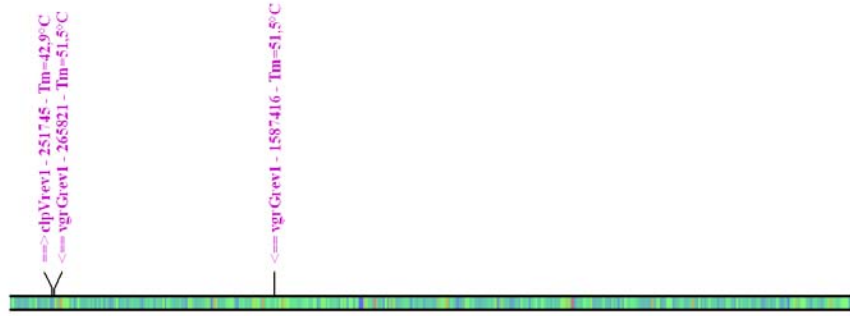
5.3 Análise *in silico* do T6SS2

Como era de se esperar, o resultado do alinhamento dos oligonucleotídeos T6SS2 às sequências genômicas de *E. coli* pelo programa BLAST demonstrou 100% de identidade entre ambos, demonstrando que as sequências desenhadas eram específicas para a amplificação de fragmentos presentes no genoma do microrganismo em estudo (Figura 2).

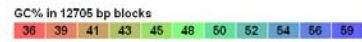
Na PCR *in silico* para o T6SS2 demonstrou-se o anelamento de todos os oligonucleotídeos e, portanto, a presença de todos os genes em questão nas cepas APEC O1 e BEN 2908. Porém, não houve anelamento desses iniciadores na cepa EHEC O157H7 str. Sakai, o que mostrou a incapacidade, por esse conjunto, de detectar o T6SS presente nessa cepa (Figura 3). O programa forneceu também o tamanho dos fragmentos a serem amplificados e a temperatura de anelamento das sequências ao DNA molde (Tabela 2).

Após definidos os novos oligonucleotídeos iniciadores, foram feitos testes para serem definidas as concentrações de cada componente do *mix* de reação e as condições da PCR. Após tal padronização, iniciou-se a genotipagem das cepas APEC para os dois conjuntos de iniciadores.

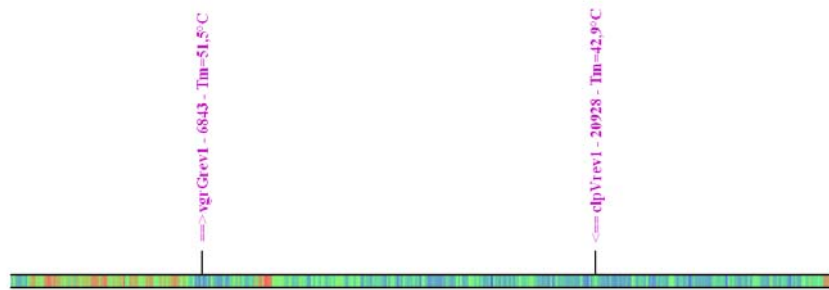
A



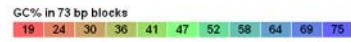
APEC O1 T6SS1
5082250 bp



B



BEN 2908 T6SS1
29545 bp



C



EHEC O157H7 Sakai T6SS1
5498476 bp

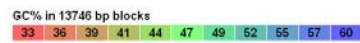


Figura 1. Anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores T6SS1 nos genomas (A) APEC O1, (B) BEN 2908 e (C) EHEC O157H7 Sakai.

A

BLAST

Basic Local Alignment Search Tool

NCBI/ BLAST/ Microbes/ Formatting Results - TM0CA6GR015

Nucleotide Sequence (292 letters)

Query ID |cl|26041
 Description None
 Molecule type nucleic acid
 Query Length 292

Database Name Microbial/562
 Description Escherichia coli genomic sequences
 Program BLASTN 2.2.25+

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [B](#) PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AEFJ01000002.1	Escherichia coli H263 cont2.2, whole genome shotgun sequence	540	540	100%	4e-152	100%	
AEFI01000036.1	Escherichia coli H252 cont2.36, whole genome shotgun sequence	540	540	100%	4e-152	100%	
ADUG01000081.1	Escherichia coli MS 57-2 E_coli57-2-1.0_Contf77.1, whole genome shotgun sequence	540	540	100%	4e-152	100%	
ADUF01000311.1	Escherichia coli MS 60-1 E_coli60-1-1.0_Contf683.1, whole genome shotgun sequence	540	540	100%	4e-152	100%	
ADUC01000308.1	Escherichia coli MS 200-1 E_coli1200-1-1.0_Contf497.1, whole genome shotgun sequence	540	540	100%	4e-152	100%	
ADTW01000017.1	Escherichia coli MS 110-3 E_coli110-3-1.0_Contf28.2, whole genome shotgun sequence	540	540	100%	4e-152	100%	
AAJU02000006.1	Escherichia coli F11 gcontig_1112495917046, whole genome shotgun sequence	540	540	100%	4e-152	100%	
NC_011745.1	Escherichia coli ED1a chromosome, complete genome	540	540	100%	4e-152	100%	
NC_011742.1	Escherichia coli S88, complete genome	540	540	100%	4e-152	100%	
NC_008563.1	Escherichia coli APEC O1, complete genome	540	540	100%	4e-152	100%	

B

BLAST

Basic Local Alignment Search Tool

NCBI/ BLAST/ Microbes/ Formatting Results - TM0FB0HM015

Nucleotide Sequence (427 letters)

Query ID |cl|3237
 Description None
 Molecule type nucleic acid
 Query Length 427

Database Name Microbial/562
 Description Escherichia coli genomic sequences
 Program BLASTN 2.2.25+

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [B](#) PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AEFJ01000001.1	Escherichia coli H263 cont2.1, whole genome shotgun sequence	789	789	100%	0.0	100%	
AEFI01000036.1	Escherichia coli H252 cont2.36, whole genome shotgun sequence	789	789	100%	0.0	100%	
ADTW01000017.1	Escherichia coli MS 110-3 E_coli110-3-1.0_Contf28.2, whole genome shotgun sequence	789	789	100%	0.0	100%	
NC_011742.1	Escherichia coli S88, complete genome	789	789	100%	0.0	100%	
NC_008563.1	Escherichia coli APEC O1, complete genome	789	789	100%	0.0	100%	
NC_007946.1	Escherichia coli UT189 chromosome, complete genome	789	789	100%	0.0	100%	
AFFA01000004.1	Escherichia coli NC101 contig12, whole genome shotgun sequence	784	784	100%	0.0	99%	
ADUG01000081.1	Escherichia coli MS 57-2 E_coli57-2-1.0_Contf77.1, whole genome shotgun sequence	784	784	100%	0.0	99%	
NC_011745.1	Escherichia coli ED1a chromosome, complete genome	784	784	100%	0.0	99%	
ADUF01000311.1	Escherichia coli MS 60-1 E_coli60-1-1.0_Contf683.1, whole genome shotgun sequence	778	778	100%	0.0	99%	
ADUC01000308.1	Escherichia coli MS 200-1 E_coli1200-1-1.0_Contf497.1, whole genome shotgun sequence	778	778	100%	0.0	99%	

Figura 2. Verificação da identidade entre oligonucleotídeos iniciadores e seqüências genômicas de *Escherichia coli*. (A) *clpV*, (B) *hcp*, (C) *icmF* e (D) *vgrG*.

C

BLAST

Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/BLAST/](#) [Microbes/](#) [Formatting Results - TM055R7P01N](#)

Nucleotide Sequence (615 letters)

Query ID kj42991
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 615

Database Name Microbia/562
Description Escherichia coli genomic sequences
Program BLASTN 2.2.25+

[Descriptions](#)

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AEFJ01000001.1	Escherichia coli H263 cont2.1, whole genome shotgun sequence	1136	1136	100%	0.0	100%	
AEFJ01000036.1	Escherichia coli H252 cont2.36, whole genome shotgun sequence	1136	1136	100%	0.0	100%	
AEFA01000004.1	Escherichia coli NC101 contig12, whole genome shotgun sequence	1136	1136	100%	0.0	100%	
ADUG01000081.1	Escherichia coli MS 57-2 E_coli57-2-1.0_Cont77.1, whole genome shotgun sequence	1136	1136	100%	0.0	100%	
ADTW01000017.1	Escherichia coli MS 110-3 E_coli110-3-1.0_Cont28.2, whole genome shotgun sequence	1136	1136	100%	0.0	100%	
NC_011745.1	Escherichia coli ED1a chromosome, complete genome	1136	1136	100%	0.0	100%	
NC_011742.1	Escherichia coli S88, complete genome	1136	1136	100%	0.0	100%	
NC_008563.1	Escherichia coli APEC O1, complete genome	1136	1136	100%	0.0	100%	
NC_007946.1	Escherichia coli UTI89 chromosome, complete genome	1136	1136	100%	0.0	100%	
ADUJF01000311.1	Escherichia coli MS 60-1 E_coli60-1-1.0_Cont583.1, whole genome shotgun sequence	1131	1131	100%	0.0	99%	
ADUC01000308.1	Escherichia coli MS 200-1 E_coli1200-1-1.0_Cont497.1, whole genome shotgun sequence	1131	1131	100%	0.0	99%	

D

BLAST

Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/BLAST/](#) [Microbes/](#) [Formatting Results - TKZXZEA5015](#)

Nucleotide Sequence (933 letters)

Query ID kj51697
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 933

Database Name Microbia/562
Description Escherichia coli genomic sequences
Program BLASTN 2.2.25+

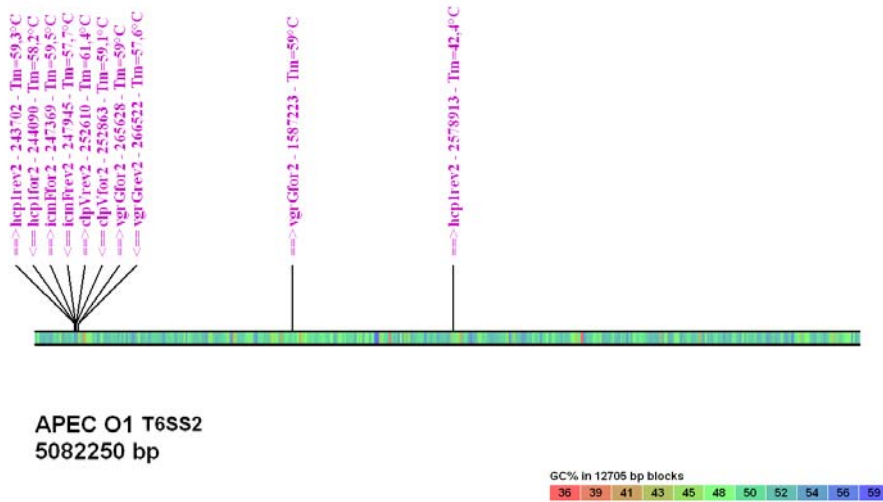
[Descriptions](#)

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

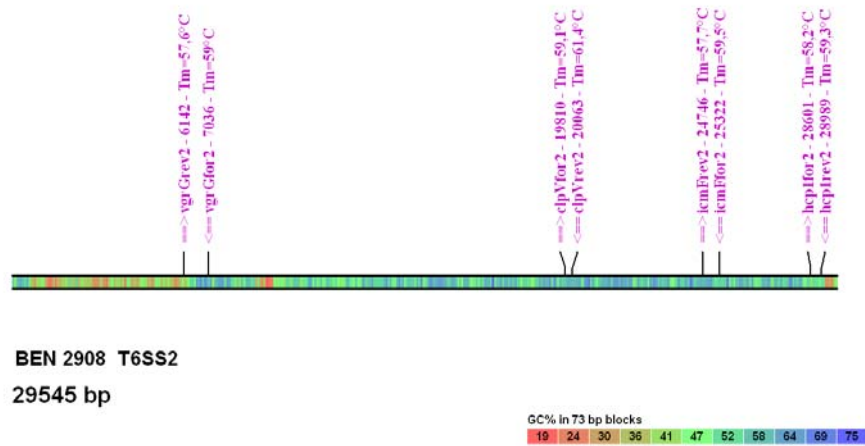
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AAJU02000006.1	Escherichia coli F11 gcontig_1112495917046, whole genome shotgun sequence	1724	1724	100%	0.0	100%	
NC_008253.1	Escherichia coli 536, complete genome	1724	2919	100%	0.0	100%	
NC_011742.1	Escherichia coli S88, complete genome	1663	2620	100%	0.0	98%	
NC_008563.1	Escherichia coli APEC O1, complete genome	1663	2620	100%	0.0	98%	
NC_007946.1	Escherichia coli UTI89 chromosome, complete genome	1663	2620	100%	0.0	98%	
AEFJ01000003.1	Escherichia coli H263 cont2.3, whole genome shotgun sequence	1657	1657	100%	0.0	98%	
AEFJ01000005.1	Escherichia coli H252 cont2.5, whole genome shotgun sequence	1557	1557	100%	0.0	96%	
ADUG01000005.1	Escherichia coli MS 57-2 E_coli57-2-1.0_Cont15.2, whole genome shotgun sequence	1406	1406	82%	0.0	99%	
ADTW01000146.1	Escherichia coli MS 110-3 E_coli110-3-1.0_Cont210.1, whole genome shotgun sequence	1266	1266	75%	0.0	99%	
ADUC01000310.1	Escherichia coli MS 200-1 E_coli1200-1-1.0_Cont497.3, whole genome shotgun sequence	1243	1243	78%	0.0	97%	
	Escherichia coli F11 gcontig_1112495917042, whole genome shotgun						

Figura 2. *continuação*

A



B



C



Figura 3. Anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores T6SS2 nos genomas (A) APEC O1, (B) BEN 2908 e (C) EHEC O157H7 Sakai.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores para a investigação do T6SS1

Gene	Descrição	Oligonucleotídeos Iniciadores	Tamanho do Amplicon	TM
<i>icmF</i>	<i>Intracellular multiplication protein</i>	5'GGGAGATAACGCTGCTCAAG3'	502 pb	54,1 °C
		<u>5'GGGAACAGGAGAAATCGTCA3'</u>		54, °C
<i>clpV</i>	<i>caseinolytic protease V</i>	5'GTCGGCGGTCTATGAACAAT3'	400 pb	55,0 °C
		<u>5'CTGCTCCAACACCTCAGTCA3'</u>		54,6 °C
<i>vgrG</i>	<i>valine-glycine repeat protein</i>	5'CAGAAGATGCTGAACCGTGA3'	831 pb	55,0 °C
		<u>5'CTCTCCCTGCCACAAATTA3'</u>		54,8 °C
<i>hcp1</i>	<i>hemolysin-coregulated protein</i>	5'GGCAAATCCCGTCTATCTGA3'	450 pb	58,6 °C
		<u>5'GTGCTCCAATTGATGCTCT3'</u>		57,6 °C

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores para a investigação do T6SS2

Gene	Descrição	oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho do amplicon	TM
<i>icmF</i>	<i>Intracellular multiplication protein</i>	5'ATTATTCTGACACTCGATTTAC3'	615 pb	63,8 °C
		<u>5'TGAATATATCATCCATCTGTC3'</u>		64,0 °C
<i>clpV</i>	<i>caseinolytic protease V</i>	5'CTGCATAAGCATCTACTGAC3'	292pb	63,8 °C
		<u>5'CGATGTTTTTACAGTCAATC3'</u>		64,3 °C
<i>vgrG</i>	<i>valine-glycine repeat protein</i>	5'GTATCTTCCAGAATGAGGAC3'	933pb	64,1 °C
		<u>5'CATGTTTCATCACAGAAGATT3'</u>		63,9 °C
<i>hcp1</i>	<i>hemolysin-coregulated protein</i>	5'GCGGAACAATGCTCCCATATA3'	427pb	63,9 °C
		<u>5'GCGTTCAACCCGAAGAGTCA3'</u>		64,2 °C

5.4 Genotipagem das amostras

Neste trabalho, utilizaram-se dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores, aqui denominados T6SS1 e T6SS2 para verificar a presença de genes do Sistema de Secreção do Tipo 6 em uma coleção de isolados APEC. Foram genotipados 51 isolados, incluindo os controles positivos SEPT 362 (T6SS1), APEC O1 e BEN 2908 (T6SS2). Na figura 4, exemplos de géis de eletroforese, que mostram os resultados da genotipagem de algumas amostras usando-se os dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores.

Para o T6SS1, 10 (21%) dos 48 isolados analisados apresentaram os quatro genes (*clpV*, *hcp*, *icmF* e *vgrG*); 7 (15%) foram positivos para quaisquer 3 dos 4 genes; 1 (2%) apresentou 2 dos genes; 22 (45 %) apresentaram apenas 1 dos genes, e 8 (17%) foram negativos para os 4 genes. Já para o T6SS2, nenhum dos 48 isolados analisados apresentou os quatro genes; 1 (2 %) apresentou 3 dos genes; 6 (13%) apresentaram 2 dos genes; 28 (58%) apresentaram apenas 1 dos genes, e 13 (27 %) foram negativas para todos os genes (Tabela 3).

Analisando-se separadamente os genes para cada grupo, detectou-se, para o T6SS1, o gene *clpV* em 18 (37%) dos isolados, o gene *hcp* em 11(23%), *icmF* em 20 (42%), e *vgrG* em 38 (80%) dos isolados. Já para o T6SS2, *clpV* foi detectado em 34 (70%) dos isolados, *hcp* foi detectado em 4 (8%), *icmF* também foi detectado em 4 (8%), e *vgrG* em 1 (2 %) dos isolados (Tabela 4).

Tabela 3. Presença dos genes do T6SS (1 e 2) em isolados APEC

Cepa	Ave	Origem	T6SS1				T6SS2			
			<i>clpV</i>	<i>hop</i>	<i>icmF</i>	<i>vgrG</i>	<i>clpV</i>	<i>hop</i>	<i>icmF</i>	<i>vgrG</i>
RS 1	1	Intestino								
RS 2	1	Coração								
RS 3	3	Coração								
RS 4	4	Fígado								
RS 5	5	Fígado								
RS 6	N.I.	N.I.								
RS 7	6	Fígado								
RS 8	6	Fígado								
RS 9	7	Fígado								
RS 10	7	Coração								
RS 11	8	S. aéreos								
RS 13	10	Fígado								
RS 16	N.I.	N.I.								
RS 17	11	Coração								
RS 18	12	Intestino								
RS 20	13	Coração								
RS 21	14	Músculo								
RS 22	15	Fígado								
RS 23	15	Intestino								
RS 24	16	Fígado								
RS 25	16	Intestino								
RS 26	17	Fígado								
RS 27	17	Intestino								
RS 28	18	Fígado								
RS 29	18	Intestino								
RS 30	18	Coração								
RS 31	19	Fígado								
RS 32	19	Intestino								
RS 33	19	Coração								
RS 35	N.I.	N.I.								
RS 37	20	Músculo								
RS 38	21	Fígado								
RS 39	21	Intestino								
RS 40	21	Coração								
RS 41	N.I.	N.I.								
RS 42	22	Fígado								
RS 43	22	Intestino								
RS 44	22	Coração								
RS 45	23	Fígado								
RS 47	23	Coração								
RS 49	25	Músculo								
RS 50	26	Músculo								
RS 71	27	Músculo								
RS 84	28	Coração								
RS85	28	Fígado								
RS 86	28	Músculo								
RS107	30	Músculo								
RS108	30	S. aéreos								
362 (+)										
MT 78(+)										
APECO1(+)										

Colunas da esquerda para a direita: cepas, designação dos isolados; ave, diferentes aves das quais foram isoladas as bactérias; órgão: órgão de onde foram isoladas as bactérias; T6SS1 e T6SS2 mostram o resultado da genotipagem das cepas utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores T6SS1 e T6SS2, respectivamente, onde a cor preta indica presença do gene, e o branco, ausência.

Tabela 4. Prevalência dos genes (T6SS1 e T6SS2) nos isolados APEC.

Gene	Descrição	T6SS1 n= 48 (%)	T6SS2 n= 48 (%)
<i>clpV</i>	<i>caseinolytic protease V</i>	18 (37%)	34 (70%)
<i>hcp</i>	<i>hemolysin coregulated protein</i>	11 (23%)	4 (8%)
<i>icmF</i>	<i>Intracellular multiplication protein</i>	20 (42%)	4 (8%)
<i>vgrG</i>	<i>valine-glycine repeat protein</i>	38 (80%)	1 (2%)

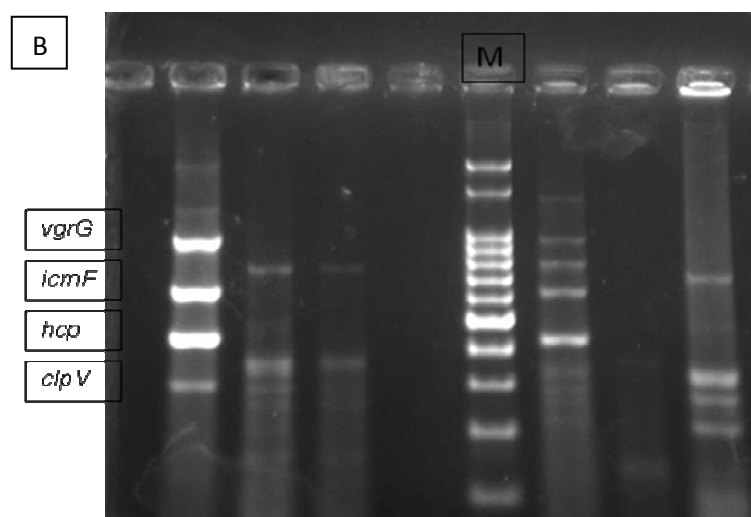
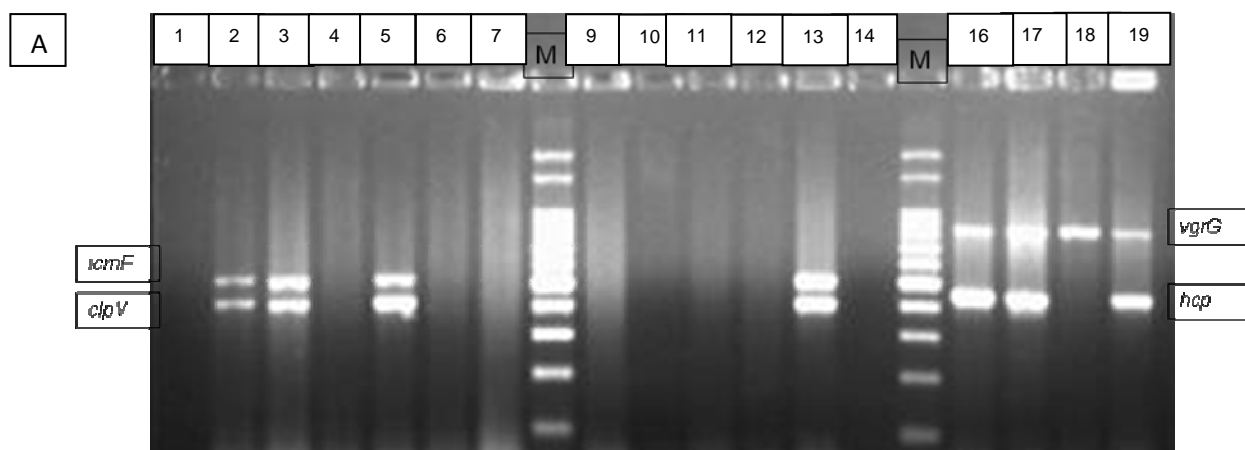


Figura 4. (A) Gel de eletroforese que mostra a amplificação dos genes do T6SS utilizando os oligonucleotídeos iniciadores T6SS1 (através de dois *mix* de reação separados: um para detectar *clpV* e *icmF* - colunas de 1 a 7 e de 9 a 14 - e outro para detectar *hcp* e *vgrG* - colunas de 16 a 19). Tamanho dos amplicons: *vgrG* 831 pb; *icmF* 502 pb; *hcp* 450 pb; *clpV* 400 pb.

(B) Gel de eletroforese que mostra a amplificação dos genes do T6SS utilizando os oligonucleotídeos iniciadores T6SS2, através de uma reação multiplex. Tamanho dos amplicons: *vgrG* 933 pb; *icmF* 615 pb; *hcp* 427 pb; *clpV* 292 pb.

M: Marcador de tamanho molecular de 100 pb.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, as análises *in silico* para o T6SS1 detectaram sítios de anelamento para todos os oligonucleotídeos iniciadores na cepa EHEC O157H7 Sakai, indicando a presença dos genes do T6SS nessa linhagem. Esse resultado confirma o esperado, já que o conjunto de iniciadores T6SS1 foi desenhado com base nessa cepa (Mougous *et al.*, 2007). Entretanto, a busca pelos mesmos sítios de anelamento nas cepas APEC O1 e BEN 2908 - cujo genoma ou a parte do genoma que contém os genes do T6SS está sequenciada - não teve o mesmo resultado. Nestas, foram detectados sítios de anelamento para apenas dois dos iniciadores, o que vai de encontro à informação a respeito da existência dos genes aqui estudados (*hcp*, *clpV*, *icmF* e *vgrG*) nessas cepas. Uma explicação para isso pode ser a existência de mais de um locus gênico para o T6SS, como o que ocorre em *Pseudomonas aeruginosa* (56), para linhagens de *E. coli*; dessa forma, os iniciadores T6SS1 podem ter sido desenhados especificamente para detectar genes de um locus, presente na cepa EHEC O157H7 Sakai, mas não necessariamente presente nas cepas APEC. Outra explicação pode ser a de que tais iniciadores não foram desenhados para detectar regiões conservadas dos genes correspondentes, o que dificultaria a detecção destes genes em outras cepas.

As análises *in silico* para o T6SS2, por sua vez, detectaram sítios de anelamento para os oligonucleotídeos iniciadores T6SS2 nas cepas APEC O1 e BEN 2908. Tal resultado está de acordo com o esperado, já que o T6SS foi detectado nessas cepas previamente (49). Porém, os mesmos sítios não foram encontrados na cepa EHEC O157H7 Sakai. Assim como no primeiro caso, esse fato pode ser explicado pela especificidade dos iniciadores em relação às cepas utilizadas como molde para o desenho e, conseqüentemente, pela ineficiência dos iniciadores em detectar regiões mais conservadas dos genes.

Analisando-se os resultados da genotipagem através dos dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores (T6SS1 e T6SS2), verifica-se que uma proporção maior de cepas positivas para os genes do T6SS foi detectada pelo conjunto de iniciadores T6SS1, à exceção do gene *clpV*, que foi detectado em maior porcentagem pelos iniciadores T6SS2. Ainda, verifica-se uma grande diferença entre

a proporção de cepas positivas para o *vgrG*, quando se comparam os dois grupos, sendo que esse gene apresentou a maior proporção entre os genes detectados pelo T6SS1, e a menor proporção entre os genes detectados pelo T6SS2. Tal resultado não era esperado, visto que os dois iniciadores deveriam amplificar o mesmo gene. Provavelmente os iniciadores T6SS2 foram desenhados para uma região do gene que não é conservada, dificultando a detecção deste nas amostras de nossa coleção. Isso pode, também, explicar a proporção diminuída de cepas positivas para os genes detectados pelos iniciadores T6SS2 em comparação com a detecção pelos iniciadores do T6SS1.

Embora tenha havido dificuldade em relacionar os resultados das genotipagens através dos dois conjuntos de iniciadores, os resultados obtidos neste trabalho indicam a presença de genes do T6SS nas cepas da nossa coleção e uma possível relação desse sistema com a patogenicidade desses isolados.

A cepa invasiva de células não-fagocitárias APEC BEN 2908 (MT 78), apresenta em seu genoma uma ilha de patogenicidade que contém os genes do T6SS. Esse resultado foi verificado nas análises *in silico* e confirmado pela genotipagem através de PCR, na qual o T6SS1 detectou três dos quatro genes, e o T6SS2 detectou os quatro genes investigados. Esse resultado sugere a possibilidade de que o T6SS exerça alguma influência sobre o fenótipo invasivo da cepa MT 78, sendo, portanto, um fator associado à virulência nessa cepa. Dessa forma, pode-se inferir que o T6SS exerça influência, também, sobre a patogenicidade das cepas APEC da nossa coleção. Porém, mesmo que seja verificada a presença do T6SS nessas cepas, para confirmar a relação desse sistema com a patogenicidade desses isolados, é necessário que seja realizado um ensaio que verifique a atividade do sistema.

7 REFERÊNCIAS

BARBIERI, N. L. Resistência a antibióticos, prevalência dos fatores associados à virulência, tipagem filogenética e perfil filogenético de isolados de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC). UFRGS, Porto Alegre, 2010.

BARNES, H.J. & GROSS, W.B., Colibacilosis. In: CALNEK, B.W. Disease of Poultry. 10. ed. Ames: Iowa state university press. p.131-141, 1997.

BINGLE, L.E., BAILEY, C.M., PALLAN, M.J. Type VI secretion: a beginner's guide. Current opinion in Microbiology, 192: 3-8, 2008.

BLISS, J. M., GARON, C. F. & SILVER, R. P. Polysialic acid export in *Escherichia coli* K1: the role of KpsT, the ATP-binding component of an ABC transporter, in chain translocation. Glycobiology 6:445-452, 1996.

BONACORSI, S., CLERMONT, O., HOUDOUIN, V., CORDEVANT, C., BRAHIMI, N., MARECAT, A., TISLEY, C., NASSIF, X., LANGE, M & BINGEN, E. Molecular analysis and experimental virulence of French and North American *Escherichia coli* neonatal meningitis isolates: identification of a new virulent clone. The Journal of Infectious Diseases 187:1895-1906, 2003.

CARDOSO, A. L. S. P., TESSARI, E. N. C., CASTRO, A. G. M. & ZANATA, G. F. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. Arquivos do Instituto de Biologia, 69 (2): 1-5, 2002.

CASCALES, E. The type VI secretion toolkit. EMBO reports, 9: 735-741, 2008.

CAZA, M., LÉPINE, F., MILOT, S. & DOZOIS, C. Specific roles of the *iroBCDEN* genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. Infection and Immunity 76: 3539-3549, 2008.

CORTES, M. A., GIBON, J., CHANTELOUP, N. K., MOULIN-SCHOULEUR, M., GILOT, P. & GERMON, P. Inactivation of *ibeA* and *ibeT* results in decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908. Infection and Immunity 76:4129-4136, 2008.

DHO-MOULIN, M. & FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Veterinary Research, 30: 299-316, 1999.

DOZOIS, C. M., DHO-MOULIN, M., BRÉE A., FAIRBROTHER, J. M., DESAUTELS, & CURTIS III, R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. Infection and Immunity 68:4145-4154, 2000.

DWARS, R. M., MATTHIJS, M. G. R., DAEMEN, A. J. J. M., VAN ECK, J. H. H., VERVELDE, L. & LANDMAN, W. J. M. Progression of lesions in the respiratory tract of broilers after single infection with *Escherichia coli* compared to superinfection with

E. coli after infection with infectious bronchitis virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127: 65-76, 2009.

DZIVA, F. & STEVENS, M.P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology*, 37 (4): 355-366, 2008

EWERS, C., LI, G., WILKING, H., KIESSLING, S., ALT, K., ANTAO, E. M., LANTURNUS, C., DIEHL, I., GLODDE, S., HOMEIER, T., BOHNKE, U., STEINRUCK, H., PHILIPP, H. C. & WIELER, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*, 297 (3):163-176, 2007.

EWERS, C., ANTÃO, E. M., DIEHL, I., PHILIPP, H. C. & WIELER, L. H. Intestine and environment of the chicken as a reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potencial. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (1): 184-192, 2009.

FALLAVENA, L. C. B., MORAES, H. L. S., SALLE, C. T. P., SILVA, A. B., VARGAS, R. S., NASCIMENTO, V. P. & CANAL, C. W. Diagnosis of skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses – a microscopic and macroscopic study. *Avian Pathology*, 29: 555-562, 2000.

FALKOW, S., Bacterial Entry into Eukaryotic Cells. *Cell*, 65: 1099-1102, 1991.
FERREIRA, A. J. & KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI, A., MACARI, M., *Doenças das Aves*. Campinas: FACTA, p. 197-205, 2000.

FILLOUX, A., HACHANI, A., BLEVES, S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, 154:1570-1583, 2008.

FLECKENSTEIN, J. M., KOPECKO, D. J., WARREN, R. L. & ELSINGHORT, E. A. Molecular characterization of the *tia* invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 64, 1996.

GERMON, P., CHEN, Y., He, L., BLANCO, J. E., BRÉE, A., SCHOULER, C., HUANG, S. & MOULIN-SCHOULEUR, M. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 151:1179-1186, 2005.

JOHNSON, T. J., SIEK, K. E., JOHNSON, S. J. & NOLAN, L. K. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *Journal of Bacteriology*, 188: 745-758, 2006.

KAPER, J. B., NATARO, J. P. & MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*, 2: 123-140, 2004.

KARIYAWASAM, S., JOHNSON, T. J., DEBROY, C. & NOLAN, L. K. Occurrence of pathogenicity island I (APEC-O1) genes among *Escherichia coli* implicated in avian colibacillosis. *Avian Diseases* 50:405-410, 2006.

KLEMM, P., HANCOCK, V. & SCHEMBRI, M. A. Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. *Environmental Microbiology Reports* 2:628-640, 2010.

KIM, K. S. *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. *Infection and Immunity* 69:5217-5222, 2001.

KIM, K. S. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nature Reviews - Microbiology* 625-634, 2008.

KOSTAKIOTI, M., NEWMAN, C.L., THANASSI, D.G., STATHOPOULOS, C. Mechanisms of Protein Export across the Bacterial Outer Membrane. *Journal of Bacteriology*, 187(13): 4306-4314, 2005.

LA RAGIONE, L. M. & WOODWARD, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Research in Veterinary Science* 73:27-35, 2002.

LI, G., LATURNUS, C., EWERS, C. & WIELER, L. H. Identification of Genes Required for Avian *Escherichia coli* Septicemia by Signature-Tagged Mutagenesis. *Infection and Immunity* 73:2818-2827, 2005.

MOUGOUS, J. D., GIFFORD, C. A., RAMSDELL, T. L. & MEKALANOS, J. J. Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Cell Biology*, 9: 797-803, 2007.

NGELEKA, M., KWAGA, J. K. P., WHITE, D. G., WHITTAM, T. S., RIDDELL, C., GOODHOPE, R., POTTER, A. A. & ALLAN, B. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infection and Immunity*, 64(8): 3118-3126, 1996.

NOLAN, L. K., Horne, S. M., Giddings, C. W., Foley, S. L., Johnson, T. J., Lynne, A. M., & Skyberg, J. Resistance to serum complement, *iss* and virulence of avian *Escherichia coli*. *Veterinary Research Communications* 27:101-110, 2003.

PACE, F., NAKAZATO, G., PACHECO, A., DE PAIVA, J. B., SPERANDIO, V. & DIAS DA SILVEIRA, W. The type VI secretion system plays a role in type 1 fimbria expression and pathogenesis of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity*, 78: 4990-4998, 2010.

PACE, F., DE PAIVA, J. B., NAKAZATO, G., LANCELLOTTI, M., SIRCILI, M. P., STEHLING, E. G., DIAS DA SILVEIRA, W & SPERANDIO, V. Characterization of

lcmF of type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. *Microbiology*, 157: 2954-2962, 2011.

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

POURBAKHS, S. A., BOULIANNE, M. B., MARTINEAU-DOIZE, M. & FAIRBROTHER, J. M. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Veterinary Microbiology*, 58: 195-213, 1997a.

POURBAKHS, S. A., DHO-MOULIN, M., BRÉE, A., DESAUTELS, C., MARTINEAU-DOIZE, M. & FAIRBROTHER, J. M. Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis* 22: 331-341, 1997b.

PUKATZKI, S., MA, A. T., STURTEVANT, D., KRASTINS, B., SARRACINO, D., NELSON, W. C., HEIDELBERG, J. F. & MEKALANOS, J. J. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *PNAS*, 103: 1528-1533, 2005.

REIS, R. S. & HORN, F. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathogens* 2, 2010.

RUSSO, T. A. & JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extra-intestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181: 1753-1754, 2000.

RUSSO, T. A., CARLINO, U. B. & JOHNSON, J. R. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 69:6209-6216, 2001.

SABRI, M., CAZA, M., PROULX, J., LYMBEROPOULOS, M. H., BRÉE, A., MOULIN-SCHOULEUR, M., CURTIS III, R. & DOZOIS, C. M. Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infection and Immunity* 76:601-611, 2008.

SCHLIEKER, C., ZENTGRAFER, H., DERSCH, P., MOGK, A. ClpV, a unique Hsp100/Clp member of pathogenic bacteria. *Biological Chemistry*, 386 (11): 1115-1127, 2005.

SEXTON, J. A., MILLER, J. L., YONEDA, A., KEHL-FIE, T. E. & VOGEL, J. P. *Legionella Pneumophila* DotU and lcmF are required for stability of the Dot/lcm complex. *Infection and Immunity*, 72: 5983-5992, 2004.

SHRIVASTAVA, S. and MANDE, S.S. Identification and functional characterization of gene components of Type VI Secretion system in bacterial genomes. PLoS One, 3 (8):e2955, 2008.

SMITH, S. G. J., MAHON, V., LAMBERT, M. A. & FAGAN, R. P. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. FEMS Microbiology Letters 273:1-11, 2007.

SORSA, L. J., DUFKE, S., HEESEMANN, J. & SCHUBERT, S. Characterization of an iroBCDEN gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. Infection and Immunity 71:3285-3293, 2003.

STAWSKI, G., NIELSEN, L., ORSKOV, F. & ORSKOV, I. Serum sensitivity of a diversity of *Escherichia coli* antigenic reference strains. Correlation with an LPS variation phenomenon. Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica 98:828-838, 1990.

STORDEUR P., MARLIER, D., BLANCO, J., OSWALD, E., BIET, F. DHO-MOULIN, M. & MAINIL, J. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. Veterinary Microbiology, 84: 231–241, 2002.

TSENG, T. T., TYLER, B. M. & SETUBAL, J. C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the gene ontology. BMC Microbiology, 103: 1528-1533, 2009.

UBA Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura 2010/2011. Disponível em: <www.uba.org.br>. Acesso em: 09 nov 2011

VAN DIJK, W. C., VERBRUGH, H. A., TOL, M. E. V. D., PETERS, R. & VERHOEF, J. Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonisation. Infection and Immunity 25:603-609, 1979.

VOKES, S., REEVES, S. A., TORRES, A. G. & PAYNE, S. M. The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. Molecular Microbiology 33:63-73, 1999.

ZHAO L., GAO, S., HUAN, H., XU, X., ZHU, X., YANG, W., GAO, Q. & LIU, X. 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, 2009.