

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**INTERAÇÃO ENTRE *Escherichia coli* PATOGÊNICA AVIÁRIA (APEC)
E CÉLULAS NÃO FAGOCITÁRIAS**

Tese de Doutorado

Letícia Beatriz Matter

Porto Alegre, junho de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**INTERAÇÃO ENTRE *Escherichia coli* PATOGÊNICA AVIÁRIA (APEC)
E CÉLULAS NÃO FAGOCITÁRIAS**

Letícia Beatriz Matter

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientação: Prof^a Dr^a Fabiana Horn

Porto Alegre, junho de 2011.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Celular do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Bacteriologia do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria/RS.

*Dedico este trabalho
a todas as mulheres que com amor
cuidam dos seus filhos, realizam
suas aspirações profissionais e lutam por um mundo melhor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Professora Fabiana Horn pela oportunidade de trabalhar nesta área, por acreditar no meu potencial e por buscar recursos para financiar este trabalho.

Agradeço aos Professores Claudio Canal e Guido Lenz pelas palavras de apoio e amizade durante a supervisão.

Agradeço aos funcionários do PPGBCM, Sílvia Centeno e Luciano Saucedo pela competência e simpatia.

Agradeço ao grupo de pesquisa do Professor Guido que carinhosamente me acolheu quando ingressei no Curso de Pós-Graduação.

Agradeço aos colegas de laboratório Nicolle Barbieri, Roberta Reis, Daniel Pavanelo e Aline de Oliveira pelo apoio técnico, pela amizade e pelos bons momentos que proporcionaram nesta caminhada.

Agradeço à URI, *campus* Santo Ângelo, pela compreensão, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional e pela oportunidade de propagar adiante os ensinamentos adquiridos durante o curso de Doutorado. Agradeço aos meus colegas de trabalho pelas palavras de apoio, pela torcida e pela paciência.

Agradeço ao grupo de pesquisa da Professora Agueda Vargas e em especial a ela, por ter me acolhido no momento mais crítico deste trabalho.

Agradeço ao Rogério Ferreira e ao Rodrigo Boehrer do BioRep (UFSM) pela orientação na técnica de RT-qPCR.

Agradeço a minha família Oldemar, Marlena, Denise e Luciana pela compreensão, carinho e apoio.

Agradeço ao meu marido André pelos momentos felizes e pelo tempo dedicado, os quais contribuíram para a finalização deste trabalho. Agradeço a minha filha Anna Lara que encheu minha vida de luz e me trouxe muita inspiração.

E enfim, agradeço a todos que de alguma forma, ou com apoio técnico, palavras, gentilezas ou até um sorriso, tornaram este trabalho mais prazeroso.

LISTA DE ABREVIATURAS

afa	adesina afimbriada
AFEC	<i>Escherichia coli</i> comensal aviária
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária
chuA	gene receptor de heme (<i>Heme receptor gene - E. coli haem utilization</i>)
cnf 1/2	fator citotóxico necrotizante
ColV	plasmídeo de Colicina V
crl	curli (<i>Curli fiber gene</i>)
cvi/cva	gene que codifica a Colicina V
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleosídeos trifosfatados
dra	adesina Dr (<i>Dr antigen-specific adhesin</i>)
EAST1	citotoxina estável ao aquecimento (<i>heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative E. coli</i>)
ECOR	tipagem filogenética de <i>Escherichia coli</i>
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extra-intestinal
F1	fímbria tipo 1
fyuA	receptor da captação de ferro (<i>Ferric yersinia uptake - yersiniabactin receptor</i>)
gimB	ilha de patogenicidade associada a NMEC (<i>Genetic island associated with newborn meningitis</i>)
hlyA	hemolisina A
hra	adesina de aglutinação resistente à temperatura
ibeA	invasina do endotélio cerebral
iha	adesina regulada pelo ferro (<i>Iron-regulated-gene-homologue adhesion</i>)
ireA	elemento responsável ao ferro
iro	genes da Salmoquelina
irp2	proteína repressível por ferro (<i>Iron repressible protein yersiniabactin synthesis</i>)
iss	aumento da resistência ao soro (<i>increased serum survival</i>)
iuc/iut	genes da Aerobactina
kpsMT II	cápsula II (<i>Group II capsule antigens</i>)

LB ágar	ágar Luria Bertani
LPS	lipopolissacarídeo
malX	ilha de patogenicidade (Pathogenicity-associated island marker)
mat	fímbria associada à meningite (<i>meningitis associated and temperature regulated fimbriae</i>)
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
neuC	cápsula K1 (<i>K1 capsular polysaccharide</i>)
NMEC	<i>Escherichia coli</i> causadora da meningite do recém-nascido
ompA	proteína de membrana externa (<i>Outer membrane protein</i>)
pap	pilus associado à pielonefrite
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PIB	produto interno bruto
pic	autotransportador serina-protease
RNA	ácido ribonucléico
sat	toxina secretada (<i>secreted autotransporter toxin</i>)
sfa/focCD	fímbria específica ao ácido siálico (<i>S fimbriae sialic acid-specific and FIC fimbriae</i>)
sitABCD	sistema de transporte de ferro
STM	mutagênese marcada por assinatura
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
tia	invasina toxigênica (<i>toxigenic invasion locus in ETEC strains</i>)
traT	proteína de transferência (<i>Transfer Protein</i>)
tsh	hemaglutinina sensível à temperatura
UFC	unidade formadora de colônia
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
VAGs	fatores associados à virulência
vat	toxina vacuolizante (<i>vacuolating autotransporter toxin</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	A importância da avicultura na economia brasileira	13
1.2	Agente patogênico: <i>Escherichia coli</i>	13
1.3	Relação das ExPEC com <i>E. coli</i> intestinais humanas	14
1.4	<i>E. coli</i> patogênica aviária (APEC) e a colibacilose	15
1.5	Virulência e fatores de virulência	16
1.5.1	Adesinas	17
1.5.2	Invasinas	24
1.5.3	Colicina V	25
1.5.4	Resistência ao soro	25
1.5.5	Sistemas de aquisição de ferro	26
1.5.6	Toxinas Bacterianas	28
1.5.7	Outros fatores de virulência	29
1.6	Sistema de Regulação da Virulência	30
1.7	Componentes Celulares Receptores de Adesinas	30
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo Geral	33
3.2	Objetivos Específicos	33
4	RESULTADOS	34
4.1	AVIAN PATHOGENIC <i>Escherichia coli</i> MT78 INVADES CHICKEN FIBROBLASTS	34
4.1.1	Introduction	34
4.1.2	Materials and Methods	35
4.1.3	Results	36
4.1.4	Discussion	40
4.1.5	Conclusion	41
4.1.6	References	41
4.2	AVIAN PATHOGENIC <i>Escherichia coli</i> STRAINS ADHERE TO BUT DO NOT INVADE HUMAN UMBILICAL ENDOTHELIAL CELLS	43
4.2.1	Introduction	43
4.2.2	Materials and Methods	44
4.2.3	Results	46
4.2.4	Discussion	51
4.2.5	Conclusion	52
4.2.6	References	53
4.3	INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>ibeA</i> E <i>gimB</i> NA INTERAÇÃO ENTRE <i>Escherichia coli</i> PATOGENICA AVIÁRIA INVASIVA E FIBROBLASTOS AVIÁRIOS	56
4.3.1	Introdução	57
4.3.2	Materiais e Métodos	58
4.3.3	Resultados	62
4.3.4	Discussão	65
4.3.5	Conclusões	69
4.3.6	Referências	69
5	DISCUSSÃO GERAL DA TESE	73

6	PERSPECTIVAS	76
7	REFERÊNCIAS.....	78
8	ANEXOS	89
8.1	Anexo A: Oligonucleotídeos usados para a detecção de genes associados à virulência em cepas APEC.....	89
8.2	Anexo B: Gráfico do ensaio de invasão com citocalasina	91
8.3	Anexo C: Gráfico do ensaio de invasão com fibroblastos e células endoteliais EAhy926	92
8.4	Anexo D: Gráfico do percentual de invasão em fibroblastos.....	93
8.5	Anexo E: Microscopia de varredura mostrando a cepa A2363 aderindo na célula eucariótica EAhy926 através de estruturas filamentosas.	94

RESUMO

Neste trabalho foi estudada a interação da *E. coli* patogênica aviária (APEC), agente etiológico da colibacilose aviária, e células não fagocitárias. A APEC é uma ExPEC (*E. coli* extra-intestinais), grupo que também inclui a UPEC (*E. coli* uropatogênica) e a NMEC (*E. coli* de meningite neonatal). Foi analisado o comportamento de 8 cepas APEC - MT78, IMT2470, A2363, UEL31, UEL13, UEL17, IMT5155, UEL29 - frente a duas linhagens de células não-fagocitárias, fibroblastos aviários CEC-32 e células endoteliais humanas EAhy926. Foi realizada a genotipagem de 33 genes associados à virulência, verificou-se capacidade de associação (adesão e invasão), de invasão e de multiplicação intracelular, de citotoxicidade e de ativação das caspases 3/7 das cepas após infecção de fibroblastos aviários. Foi observado que enquanto todas as cepas foram capazes de aderir aos fibroblastos aviários, somente a cepa MT78 foi capaz de invadí-los em níveis comparáveis à bactéria invasiva *Salmonella* Typhimurium SL1344. As cepas APEC não induziram ativação de caspases 3/7, nem foram citotóxicas aos fibroblastos. Uma vez que a cepa invasiva, MT78, e a não invasiva, IMT2470, apresentam genótipos de virulência muito similares, foi realizado o estudo da expressão por RT-PCR dos genes de virulência da bactéria crescida com e sem fibroblastos aviários, por 3 h. Os resultados mostraram a expressão de adesinas, sideróforos e protectinas/estruturas de resistência ao soro para ambas as cepas na ausência e presença de fibroblastos. A análise da expressão dos genes *fimH*, *ompA*, *ibeA* e *gimB* pela técnica RT-qPCR revelou a repressão do gene *fimH* na MT78, mas indução do mesmo na IMT2470. Já as invasinas, *gimB* e *ibeA*, estavam induzidas em MT78 e reprimidas em IMT2470, enquanto o gene *ompA* estava sendo expresso em ambas as cepas. A expressão das invasinas *gimB* e *ibeA* explica em parte o fenótipo invasivo da MT78. No presente estudo também foi analisado o comportamento das 8 cepas APEC em relação ao perfil de associação, invasão e multiplicação intracelular ao infectarem células EAhy926. As cepas não mostraram capacidade de invadir as células mas apresentaram um nível de associação muito superior ao dos fibroblastos aviários (até 14 vezes superior para algumas cepas). Este trabalho mostrou que o ensaio *in vitro* com CEC-32 é um modelo adequado para o estudo da interação celular entre APEC e células eucarióticas e agregou mais conhecimento sobre o patótipo.

Palavras-chave: colissepticemia, adesinas, invasinas, *E. coli* patogênica aviária.

ABSTRACT

In this work the interaction between avian pathogenic *E. coli* (APEC), the etiological agent of avian colibacillosis, and non-phagocytic cells was studied. APEC is an ExPEC (extraintestinal *E. coli*), a group that also includes UPEC (uropathogenic *E. coli*) and NMEC (*E. coli* neonatal meningitis). We analysed the behavior of 8 APEC strains - MT78, IMT2470, A2363, UEL31, UEL13, UEL17, IMT5155, UEL29 - against two non-phagocytic cell lines, avian fibroblasts (CEC-32) and human endothelial cells (EAhy926). Strains were genotyped for 33 virulence associated genes, and investigated the association capacity (adhesion and invasion), the invasion ability, intracellular multiplication, cytotoxicity and activation of caspases 3/7 of the strains after infecting avian fibroblasts. While all strains were able to adhere to avian fibroblasts, only the strain MT78 was able to invade them at levels comparable to the invasive bacterium *Salmonella* Typhimurium SL1344. APEC strains could not induce activation of caspases 3/7, nor were cytotoxic to fibroblasts. Since the invasive MT78 and the non-invasive IMT2470 strains presented very similar virulence genotypes, the expression of virulence genes of the bacteria grown in the absence and presence of avian fibroblasts by 3 h was analysed by RT-PCR. Results showed the expression of adhesins, siderophores and protectins/serum resistance structures for both strains in the two culture conditions, with and without fibroblasts. Analysis of the expression of *fimH*, *ompA*, *ibeA* and *gimB* by RT-qPCR revealed the repression of *fimH* in MT78, but the induction in IMT2470. In relation to *ibeA* and *gimB* invasins, they were induced in MT78 but repressed in IMT2470, while the *ompA* gene was expressed in both strains. The expression of invasins partly explains the invasive phenotype of MT78. It was also analysed the behaviour of the strains in relation to the association profile, invasion and intracellular multiplication when infecting EAhy926 human endothelial cells. The strains showed no ability to invade endothelial cells but showed a high level of association (up to 14 times higher than for fibroblasts cells for some strains). This study showed that the CEC-32 *in vitro* model is suitable for the study of cellular interaction between APEC and eukaryotic cells, and added more knowledge about the pathotype.

Key-words: colisepticemia, adhesins, invasins, Avian pathogenic *E. coli*

1 INTRODUÇÃO

1.1 A importância da avicultura na economia brasileira

A avicultura brasileira ocupa lugar de destaque na economia do país, empregando mais de 4,5 milhões de pessoas, direta ou indiretamente. Sua produção supera 12 milhões de toneladas de carne por ano e representa sozinha cerca de 1,5% do produto interno bruto (PIB) nacional (www.aviculturaindustrial.com.br). A produção da avicultura mantém o país no terceiro lugar entre os maiores produtores mundiais, atrás somente de Estados Unidos e China (ABEF, 2009/2010). O Brasil teve participação de 42 % nas vendas no mercado internacional, mantendo sua posição de maior exportador mundial de carne de frango, a qual é líder absoluto desde 2004, possuindo como maiores mercados o Oriente Médio e a Ásia (www.uba.org.br). Assim, medidas que garantam a qualidade e a segurança na produção e no produto são de interesse nacional.

1.2 Agente patogênico: *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo, descrito pela primeira vez em 1885 por Theodor von Escherich. É uma bactéria que tem ampla distribuição na natureza e uma grande diversidade genética e comportamental. Ela faz parte da microbiota normal do intestino de animais de sangue quente e répteis. Entretanto, a aquisição, através de elementos genéticos móveis (transposons, profagos, integrons, plasmídios, etc.), de uma combinação de genes associados à virulência leva determinadas cepas a causarem doenças intestinais e extra-intestinais (revisado em Kaper *et al*, 2004; Croxen e Finlay, 2010; Langille *et al*, 2010).

A perda e a aquisição de elementos genéticos móveis têm função central na montagem do genoma da bactéria patogênica. Muitos dos fatores de virulência da *E. coli* encontram-se em ilhas de patogenicidade alocadas nos plasmídios ou no cromossomo, as quais não são encontradas em bactérias não-patogênicas (Croxen e Finlay, 2010). A aquisição de novos genes geralmente fornece vantagens à bactéria, permitindo-a colonizar um novo nicho, no qual a pressão seletiva seleciona cepas capazes de sobreviver e se multiplicar neste novo ambiente.

Entre os patótipos capazes de causar infecções no trato intestinal, pode citar-se: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli*

enteroinvasiva), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), DAEC (*E. coli* difusamente aderente) e AIEC (*E. coli* aderente e invasiva). Entre as *E. coli* causadoras de doenças extra-intestinais, chamadas coletivamente de ExPEC, estão a UPEC (*E. coli* uropatogênica), NMEC (*E. coli* de meningite neonatal), SePEC (*E. coli* associada a septicemia) e APEC (*E. coli* patogênica para aves) (revisado em Ferreira e Knöbl, 2000; Kaper *et al.*, 2004). Cada patotipo tem seu próprio mecanismo característico de interagir com a célula hospedeira, embora às vezes tenham como alvo a mesma maquinaria do hospedeiro (Croxen e Finlay, 2010).

Estudos reportam que cepas de APEC apresentam-se genética e fenotipicamente semelhantes às ExPEC humanas UPEC e NMEC. Essa constatação foi realizada por sequenciamento *multilocus* (MLST), sorotipagem, filotipagem por EcoR, genotipagem dos fatores de virulência e análise da expressão *in vivo* de UPEC, NMEC e APEC em modelos de infecção em camundongos e galinhas (Zhao *et al.*, 2009; Tivendale *et al.*, 2010; Bauchart *et al.*, 2010). Alguns autores sugerem que pode existir pouca ou nenhuma dependência de especificidade ao hospedeiro entre as *E. coli* humanas e aviárias e, conseqüentemente, a APEC poderia constituir um risco zoonótico (Rodrigues-siek *et al.*, 2005; Ewers *et al.*, 2007; Peigne *et al.*, 2009; Chanteloup *et al.*, 2011). Além disso, estudos relacionando a APEC com cepas de *E. coli* intestinais aviárias e ambientais verificaram muita semelhança de certos isolados em relação à presença dos fatores de virulência, à sequência no *multilocus*, ao sorogrupo, à resistência ao soro, à filogenia pelo EcoR, e à patogenicidade *in vivo*, confirmando a possibilidade do intestino aviário ser o reservatório de cepas patogênicas de animais e humanos (Ewers *et al.*, 2009).

O conhecimento dos mecanismos de interação da bactéria com a célula do hospedeiro é muito mais conhecidos para as *E. coli* patogênicas intestinais, a UPEC e a NMEC. Em relação às APEC, são escassas as informações a respeito dos mecanismos celulares e moleculares que permitem a instalação da doença. Apesar de haver muitos estudos sobre fatores de virulência, existe uma carência de informações no que se refere às combinações dos genes essenciais para induzir uma infecção por APEC.

1.3 Relação das ExPEC com *E. coli* intestinais humanas

Algumas cepas de ExPEC apresentam características semelhantes às cepas patogênicas intestinais. Apesar da AIEC estar associada à Doença Inflamatória Intestinal

(IBD), estudos recentes classificam-a como uma ExPEC devido ao grau de semelhança em relação ao grupo filogenético, genes de virulência e sorogrupo com *E. coli* envolvidas em sepse, infecções do trato urinário (Martinez-Medina *et al.*, 2009) e colibacilose aviária (Moulin-Schouleur *et al.*, 2006). Para Manges *et al.* (2008), a AIEC seria uma ExPEC que reside no intestino e que se aproveita do microambiente formado pela IBD. Já Abe *et al.* (2008) reportou que 6,9% das cepas de uma coleção de 225 isolados de ExPEC exibiam um fenótipo difuso-aderente, o qual é característico da bactéria patogênica intestinal DAEC. Ademais, diversos genes de virulência de patótipos intestinais, sobretudo da EAEC, já foram encontrados em algumas ExPEC, indicando que certas ExPEC podem carregar genes de virulência de *E. coli* diarreigênicas. Essas observações sugerem que ExPEC podem causar infecções intestinais e vice-versa.

1.4 *E. coli* patogênica aviária (APEC) e a colibacilose

A colibacilose é considerada a doença mais comum e de maior custo para a indústria aviária em animais entre 2 a 12 semanas de idade (Arné *et al.*, 2000). A doença pode instalar-se em diferentes locais anatômicos da ave e apresentar sintomatologia variada. Entre as manifestações mais comuns estão: doença respiratória, que frequentemente culmina em septicemia; celulite, também chamada dermatite necrótica; síndrome da cabeça inchada (sinusite com colonização da *E. coli* nos tecidos subcutâneos faciais); onfalite (infecção do embrião); e salpingite (infecção do oviduto). No caso da colissepticemia, a infecção geralmente inicia-se pelo trato respiratório superior e dissemina-se para os órgãos internos, causando normalmente a morte do animal (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Dziva e Stevens, 2008). Essa situação ocorre provavelmente devido à inalação de poeira contaminada, ou infecção viral, sendo que qualquer condição que cause um aumento na produção de muco ou perda dos cílios das vias respiratórias facilita a infecção por APEC em aves. Após atingir o baço, a infecção pode culminar em uma septicemia frequentemente fatal, acompanhada de lesões em vários órgãos, como aerossaculite, periepatite e pericardite (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; revisado em Ferreira e Knöbl, 2000).

Fatores externos ao animal, considerados ambientais, como altas concentrações de amônia no ambiente, deficiência no sistema de ventilação, exposição a extremos de temperatura, espaço limitado para a criação e deficiência no processo de desinfecção contribuem para a infecção das aves por APEC e instalação da doença. Além desses

fatores, a existência de infecções por outros agentes, como *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus paragallinarum*, Pneumovirus, vírus da Bronquite Infecciosa, doença de Marek e de New Castle, bem como a presença de micotoxinas na ração, podem deixar a ave pré-disposta à infecção por APEC. De modo geral, qualquer fator que possa lesionar o epitélio respiratório, inclusive vacinas com vírus atenuado, pode tornar a ave susceptível à doença (revisado em Ferreira e Knöbl, 2000).

Na maioria dos países, O1, O2, O8, O18 e O78 representam os sorotipos predominantes de *E. coli* na colibacilose aviária (revisado em Dziva e Steves, 2008; Ewers et al, 2007; Rodriguez-Siek et al, 2005); no Brasil Ferreira e Knöbl (2000) alegam que os sorotipos mais comuns são: O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119 e O152.

A colibacilose é uma doença que pode ser controlada por agentes antimicrobianos, no entanto, o uso destes agentes é indesejado em função dos resíduos que permanecem na carne e da indução ao aparecimento de cepas bacterianas resistentes. Ademais, o tratamento deveria ser realizado na fase inicial da doença, para as consequências serem mínimas; entretanto, nessa fase a sintomatologia ainda não é evidente. A utilização de vacina tem levado à soroproteção de cepas e de sorotipos específicos, sendo de pouca abrangência (revisado em Dziva e Steves, 2008), necessitando ser desenvolvida uma vacina de proteção cruzada para total proteção. O entendimento dos mecanismos celulares e moleculares da doença fornecerá subsídios para o desenvolvimento de formas mais eficientes e racionais de combate e prevenção da doença.

1.5 Virulência e fatores de virulência

Como já comentado, cepas bacterianas patogênicas diferem das comensais pela aquisição e expressão de conjuntos de genes de virulência específicos que favorecem a sua disseminação no hospedeiro. Em geral, patógenos expressam fatores de virulência tais como moléculas de adesão, sistemas de invasão, enzimas, toxinas, moléculas de resistência ao soro e sistemas de captura de ferro (sideróforos) como estratégias para penetrar, se disseminar e encontrar um lugar conveniente para se multiplicar no hospedeiro (revisado em Magalhães *et al.*, 2007).

Vários são os genes associados à virulência de APEC já descritos. No entanto, não existe um conjunto específico de genes que caracterizem o patótipo, inclusive para

um mesmo sorogrupo. Cepas APEC podem carecer de um ou mais genes associados à virulência e ainda assim serem virulentas, sugerindo múltiplos mecanismos alternativos mediando a patogenicidade (Dziva e Stevens, 2008).

Mesmo as cepas distintas geneticamente podem produzir a mesma infecção, pois podem apresentar fatores de virulência que, apesar de diferentes, possuem a mesma função e atuam no mesmo sítio do hospedeiro. Dessa forma, parecem existir estratégias comuns que tornam a bactéria um patógeno eficiente (Ewers *et al.*, 2004).

Os fatores de virulência mais estudados em APEC são as adesinas, sistema de aquisição de ferro, fatores envolvidos na resistência ao soro e à fagocitose, toxinas e invasinas (Dziva e Stevens, 2008; La Ragione e Woodward; 2002). Segue abaixo uma descrição breve dos genes comumente associados à virulência em APEC.

1.5.1 Adesinas

A aderência bacteriana às superfícies do hospedeiro ocorre nos primeiros momentos da interação da bactéria com o hospedeiro e representa um importante passo para a colonização dos tecidos. As estruturas que realizam a aderência possuem afinidade a receptores específicos da célula eucariótica, e a expressão diferencial das adesinas pode regular a preferência por colonizar diferentes órgãos durante a infecção. Nas bactérias Gram-negativas, essas estruturas podem ser fimbriadas ou afimbriadas (revisado em Antão *et al.*, 2009).

Na maioria das vezes, as adesinas formam estruturas morfologicamente distintas, chamadas fímbrias. Tem sido encontrada uma variedade muito grande de adesinas nas ExPEC, entre elas: fímbria tipo 1, fímbria P, curli, fímbria S, fímbria F1C, fímbria Dr, adesinas afimbriadas, hemaglutinina sensível a temperatura, aglutinina resistente ao calor, adesina homóloga ao gene regulador de ferro, fímbria associada à meningite e regulada pela temperatura, entre outras (revisado em Antão *et al.*, 2009).

Muitas delas são capazes de aglutinar eritrócitos e por isso são consideradas hemaglutininas.

É importante lembrar, no entanto, que nem todas as adesinas são necessariamente fatores de virulência, pois bactérias não patogênicas também podem possuir adesinas, por exemplo, aquelas utilizadas para fixação às mucosas do trato gastrointestinal e que não causam danos ao hospedeiro (Vidotto *et al.*, 1997; La Ragione & Woodward, 2002).

As *E. coli* intestinais também possuem adesinas, como por exemplo as fímbrias do tipo 1, F1C e curli, importantes na colonização intestinal. Elas podem desempenhar um papel importante tanto para as comensais como para as patogênicas intestinais. Neste trabalho, serão descritas as fímbrias importantes às ExPEC.

1.5.1.1 Fímbria do tipo 1 (F1)

A fímbria do tipo 1 (F1), primeira estrutura com característica de fímbria identificada, é a adesina mais comum em *E. coli*, tanto em cepas patogênicas como em não-patogênicas. Ela consiste em um filamento de 0,1 a 2 µm de comprimento presente na superfície bacteriana. Até o momento, sabe-se que para a sua síntese é necessária a expressão de nove genes localizados no operon *fim* (*Type 1 fimbriae D-mannose specific adhesin*) (Hinde *et al.*, 2005).

A sua montagem envolve as proteínas FimC (chaperona) e FimD (*usher* – condutor para a membrana externa), a subunidade maior FimA e as subunidades menores FimF, FimG e FimH. Na extremidade externa da fímbria está localizada a FimH, responsável pela função adesina da estrutura e sensível a manose. A expressão do operon *fimAICDFGH* é fase variável e é mediada por elemento de inserção (EI) que contém o promotor do operon *fim*. Dependendo da orientação deste promotor (*on* ou *off*) ocorre a transcrição dos genes e a expressão da fímbria. A percentagem de bactérias em uma cultura que possui o promotor na orientação ligada determina a percentagem de bactérias que expressam a fímbria tipo 1. A orientação do EI é regulada por vários sinais ambientais como a temperatura, osmolaridade, pH, presença de aminoácidos, e é mediada por recombinases sítio-específicas (FimB e FimE) e outras proteínas de ligação ao DNA (Cortes *et al.*, 2008; Hinde *et al.*, 2005).

A fímbria tipo 1 tem a capacidade de se ligar à D-manose, o que permite a ligação a várias células eucarióticas, tais como intestinais, pulmonares, de bexiga, epitélio renal e células inflamatórias. Apresenta também função aglutinina quando em contato com eritrócitos (La Ragione e Woodward, 2002).

Na colibacilose, a fímbria tipo 1 tem sido associada aos processos de adesão e colonização das vias respiratórias da ave (Dozois *et al.*, 1994; Pourbakhsh *et al.*, 1997 a,b,c La Ragione *et al.*, 2000; Arné *et al.*, 2000). No entanto, em experimento *in vivo* um mutante *fim* colonizou a traquéia, pulmão e órgãos internos da ave na mesma proporção que a cepa selvagem (Marc *et al.*, 1998), sugerindo a existência de outras adesinas que

seriam expressas e compensariam a falta da fímbria. Em APEC, a fímbria do tipo 1 pode ser encontrada em 70 a 100 % dos isolados (Ewers *et al.*, 2007; Dho-Moulin e Fairbrother, 1999). Além disso, a fímbria do tipo 1 confere resistência aos efeitos bactericidas dos macrófagos após a fagocitose da bactéria (Baorto *et al.*, 1997).

Foi verificado também que *E. coli* comensais expressam variáveis da FimH que se ligam com alta afinidade em resíduos de trimanose, enquanto bactérias uropatogênicas apresentam moléculas de FimH com alta afinidade por resíduos de monomanose, os quais são encontrados em grande quantidade no trato urinário (Hung *et al.*, 2002).

De uma maneira geral, trabalhos mostram que a expressão da fímbria tipo 1 é bastante sensível e alterada em resposta às condições do ambiente, tais como alta osmolaridade, variação do pH e da temperatura. Além disso, também já foi observado que a expressão é induzida no início da fase estacionária e diminuída em meio sob agitação (Crépin *et al.*, 2008; Gally *et al.*, 1993; Schwan *et al.*, 2002).

1.5.1.2 Fímbria P ou F11

Outra fímbria que pode também estar presente em APEC é a fímbria P (*P blood antigen*), também chamada F11, codificada pelo gene cromossômico *pap* (*Pyelonephritis-associated pilus*) e descrita em UPEC como um pilus associado à pielonefrite (Sauer *et al.*, 2000). Ela é morfológicamente semelhante à fímbria tipo 1, no entanto, ela se liga ao carboidrato α -D-Galactopiranosil-(1-4)- β -D-galactopiranosídeo do antígeno específico glicoesfingolípídeo do grupo sanguíneo P encontrado na superfície das células epiteliais do rim (Korhonen *et al.*, 1982). Por microscopia imunoeletrônica verificou-se que a fímbria P é um heteropolímero composto por uma subunidade maior *papA*, por duas menores *papE* e *papF*, e pela adesina *papG* (Lindberg *et al.*, 2008). Variáveis da *PapG* reconhecem diferentes mas relacionados receptores de Gal α -(1-4)-Gal distribuídos nos tecidos de um hospedeiro ou de uma população de hospedeiros, assim a expressão diferencial da adesina *PapG* conduz à especificidade ao tecido e ao hospedeiro (Pizarro-Cerdá e Cossart, 2006).

Estudos têm mostrado que mais de 80% das cepas isoladas de pielonefrite humana expressam a fímbria P e que esta desempenha um importante papel nas infecções do trato urinário (Tewari *et al.*, 1994). Em aves infectadas experimentalmente com cepas APEC, a expressão desta fímbria não foi observada durante a colonização da

traquéia, mas foi observada durante e colonização dos sacos aéreos, pulmões e órgãos internos (Pourbakhsh *et al.*, 1997a; Pourbakhsh *et al.*, 1997b). Desta maneira, ao contrário da fímbria F1, a fímbria P aparentemente não é importante para a colonização inicial do trato respiratório superior, mas pode ser determinante nos estágios posteriores, na colonização dos órgãos internos, a fim de causar infecção sistêmica (Dozois *et al.*, 1995; Pourbakhsh *et al.*, 1997b; La Ragione & Woodward, 2002).

Em geral, o gene *pap* tem sido encontrado em 25-30% dos isolados de APEC (Stordeur *et al.*, 2002, Ewers *et al.*, 2007); devido a sua baixa prevalência, a fímbria P não tem sido considerada essencial à patogênese da colibacilose.

1.5.1.3 Fímbria S e Fímbria F1C

A fímbria S, outra adesina encontrada em APEC, é codificada pelo conjunto de genes cromossômicos *sfa* (*S fimbriae sialic acid-specific*). Esse conjunto consiste em *sfaA*, que codifica a subunidade maior SfaA, e *SfaS*, *SfaH* e *SfaG*, que codificam as três subunidades menores. A subunidade protéica distal SfaS tem função adesina e reconhece resíduos de ácido siálico, o que dá origem ao seu nome (Antão *et al.*, 2009). A expressão de *sfa* está relacionada às condições do ambiente, como temperatura, osmolaridade e presença de glicose no meio (Balsalobre *et al.*, 2003).

A fímbria S é similar morfológicamente às fímbricas P e F1 e faz parte de uma família de adesinas fimbriadas produzidas por *E. coli* extra-intestinais (Hacker *et al.*, 1993). Ela ocorre principalmente em UPEC, mas tem sido associada também às cepas causadoras de sepse e meningite em recém-nascidos. Nas ExPEC, sua prevalência é cerca de 50% em UPEC, 24% em NMEC e 4,2-9,2% em APEC (Ewers *et al.*, 2007).

Estudos mostram que a fímbria S tem a capacidade de se ligar ao endotélio vascular de grandes vasos no rim, endotélio capilar do interstício e epitélio dos glomérulos, os quais são cobertos por ácido siálico (Antão *et al.*, 2009). Além disso, a fímbria S tem a capacidade de se ligar aos componentes da matriz extracelular fibronectina, laminina e sialoglicoproteínas das células do endotélio microvascular cerebral, o que poderia auxiliar na migração através da barreira hematoencefálica (Antão *et al.*, 2009).

A fímbria F1C é uma fímbria estruturalmente semelhante à F1, porém não aglutina eritrócitos humanos. Ela contribui para a adesão da UPEC aos ductos coletores e túbulos distais do rim e desempenha um papel importante na colonização intestinal de

cepas comensais. É codificada pelo gene *foc*, o qual apresenta grande homologia ao *sfa* (fimbria S), apresentando inclusive epítomos proteicos comuns, no entanto, diferem na especificidade de seus receptores. Até o momento o exato receptor ainda permanece desconhecido, o que se sabe é que tem a capacidade de se ligar às ceramidas (Antão *et al.*, 2009).

1.5.1.4 Fimbria Dr

Essa fimbria consiste em uma estrutura com função hemaglutinina resistente à manose, independente do grupo sanguíneo P. Ela é expressa normalmente por cepas UPEC pertencentes ao sorogrupo O75 e tem afinidade por estrutura semelhante ao cloranfenicol. A denominação Dr vem do fato dela se aderir a antígeno do grupo sanguíneo Dr da membrana basal tubular e da cápsula de Bowman do rim humano. Ela é quimicamente similar às demais fimbrias, mas morfologicamente diferente pois está arranjada de forma enrolada. A fimbria Dr é codificada por um operon denominado *dra* (*Dr antigen-specific adhesin*) no qual os quatro genes *drA*, *drC*, *drD* e *drE* são requeridos para a expressão completa do fenótipo de hemaglutinina resistente à manose (Antão *et al.*, 2009).

Em ExPEC, a prevalência da fimbria Dr é baixa: 1,3% em APEC, 6,1% em UPEC e 3,8% em NMEC (Ewers *et al.*, 2007).

1.5.1.5 Curli

É uma estrutura enrolada encontrada na superfície externa da maioria das cepas de *E. coli*. Ela é composta por um único tipo de subunidade, a curlina. A proteína do curli é codificada pelo gene *crl* localizado no *cluster csg* (*curlin subunit gene*). A expressão do curli é complexa, envolvendo dois operons (*csgB*, *csgA*, *csgC* e *csgD*, *csgE*, *csgF*, *csgG*) e uma série de elementos controle como H-NS, RpoS e OmpR. Sua expressão sofre redução quando em temperatura superior a 30 °C e alta osmolaridade, para a maioria das cepas (Olsen *et al.*, 1993a; Olsen *et al.*, 1993b). Apesar da maioria dos isolados, patogênicos e não patogênicos, possuir o gene, somente certas cepas são capazes de montar as subunidades. A proteína curli é capaz de aderir a diferentes proteínas da matriz celular e do plasma, como fibronectina, laminina, plasminogênio,

ativador do plasminogênio e Complexo Maior de Histocompatibilidade (Olsen *et al.*, 1998).

Gophna *et al.* (2001) verificaram que o aumento da expressão do curli na cepa K-12, proporcionado pela inserção de plasmídeo com o *cluster csg*, causava a internalização da bactéria em HeLa, T24, HEp-2 e células embrionárias de retina de galinha. Os autores também verificaram que o *cluster csg* da cepa APEC O78 (de septicemia aviária) induzia a internalização da bactéria em níveis mais altos do que o encontrado na cepa K-12 não patogênica. Segundo os autores, a diferença estava na sequência de dois aminoácidos na porção CsgD, posições 19 e 110, e que esta sequência era similar ao do cluster da *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium.

Apesar de certas evidências da participação do curli no processo de invasão de APEC em células eucarióticas (Gophna *et al.*, 2001) e de tecido aviário (La Ragione *et al.*, 2000b), a sua função como invasina ainda não está estabelecida.

1.5.1.6 Adesina afimbriada

Entre as adesinas afimbriadas encontra-se a AFA, codificada pelo gene *afa*. Ela apresenta característica hemaglutinina resistente à manose. Ela consiste em uma estrutura fina, de difícil visualização, com propriedades bioquímicas diferentes das fimbrias. A subunidade AfaE é a mais interna e tem sido considerada adesina, enquanto a extremidade mais externa, AfaD, é uma invasina. A AfaD tem sido relacionada à invasão de células epiteliais por bactérias enteropatogênicas, a qual ocorre quando a bactéria expressa um determinado nível de AfaD na sua superfície (Bouguéneq, 2005).

O gene *afa* está localizado em uma família de pelo menos 4 operons denominada *afa*, a qual inclui também o operon da fimbria Dr. A purificação e caracterização da proteína mostrou que AFA é encontrada tanto na superfície da bactéria quanto livre no meio de cultivo, apresentando-se como um agregado macromolecular formado por um polipeptídeo de uma única subunidade repetida (Antão *et al.*, 2009; Bouguéneq, 2005).

Pelo fato das adesinas Afa e Dr pertencerem a operons relacionados e apresentarem similaridade genética, elas são designadas adesinas Afa-Dr. Elas são responsáveis pelo modelo de aderência difusa da DAEC em células HeLa e HEp-2 (Croxen e Finlay, 2010). Em APEC o gene *afa* é raramente encontrado (Ewers *et al.*, 2007).

1.5.1.7 Hemaglutinina Sensível à Temperatura

A Tsh (*Temperature sensitive hemagglutinin*) é uma hemaglutinina resistente à manose cuja hemaglutinação dos eritrócitos é alta à temperatura de 26° C, baixa a 37°C e nula a 42 °C (Provence & Curtis, 1994).

O gene *tsh* está presente em 50-70% dos isolados de APEC (Ewers *et al.*, 2007), sendo mais freqüente em isolados com alta letalidade. O gene *tsh* é plasmideal e encontra-se associado à colicina V, quando ambos estão no mesmo plasmídeo (Dozois *et al.*, 2000). Sua presença é consideravelmente menor em UPEC (4,5%) e NMEC (11,5%) (Ewers *et al.*, 2007).

A sequência da proteína Tsh apresenta homologia com proteínas da família de auto-transportadores secretadas por bactérias Gram-negativas (Stathopoulos *et al.*, 1999; Henderson *et al.*, 2004). A Tsh contribui para os estágios iniciais da infecção, incluindo a colonização dos sacos aéreos e pulmões, porém não parece contribuir para a colonização generalizada (Dozois *et al.*, 2000).

1.5.1.8 Adesinas homólogas

O gene *iha* (*Iron-regulated-gene-homologue adhesion*) codifica uma adesina, inicialmente caracterizada em *E. coli* O157:H7, que confere à bactéria a habilidade de aderir ao uroepitélio, e é encontrado frequentemente em cepas de *E. coli* uropatogênicas humanas (Johnson e Russo, 2005).

A fímbria Mat, descrita pela primeira vez por Pouttu *et al.* (2001), é codificada pelo gene *mat* (*meningitis associated and temperature regulated fimbriae*), e sua presença está associada com isolados de *E. coli* que causam meningite em recém-nascidos. A NMEC é capaz de montar a fímbria quando cultivada em caldo LB a 20°C, sendo a sua expressão influenciada pela temperatura, pois a 37°C a sua produção é bem menor. Essa mesma fímbria é denominada ECP (*E. coli* common pilus) em ETEC, EHEC e em *E. coli* comensais, sendo o gene chamado *ecp* ou *yagZ* (Rendón *et al.*, 2007; Blackburn *et al.*, 2009). A EHEC (O157:H7) produz ECP quando crescida em meio DMEM a 37°C e 26°C, mas não em LB, e a presença de 5% de CO₂ tem sido um fator estimulante para a produção de ECP em ambas temperaturas. A ECP tem se mostrado importante para a aderência de *E. coli* O157:H7 e de *E. coli* da flora normal às células eucarióticas *in vitro* (Rendón *et al.*, 2007). O alto percentual de ETEC (80%) com o gene

ecpA sugere que a sua presença pode representar uma vantagem biológica e ecológica para este patotipo (Blackburn *et al.*, 2009).

A Hra, codificada pelo gene *hrlA* (*heat resistance agglutinin*), é uma proteína da membrana externa bacteriana, amplamente distribuída em cepas UPEC (Srinivasan *et al.*, 2003). Ela é uma adesina não fimbriada que promove a aderência às células humanas do cólon e cuja atividade de aglutinação de eritrócitos humanos e de animais não é influenciada pelo calor (Srinivasan *et al.*, 2003).

1.5.2 Invasinas

Em geral, o número de invasinas descritas até o momento para ExPEC é bem mais restrito e menos investigado do que de adesinas.

O gene *ibeA* (*Invasion of brain endothelium*) tem sido considerado importante no processo de invasão de NMEC em endotélio vascular cerebral humano, estando associado aos casos de meningite no recém-nascido causada por esta bactéria. Segundo Germon *et al.* (2005) o gene *ibeA* (*Invasion of brain endothelium*) pode ter função similar no processo de invasão de células aviárias por cepas de APEC, visto participar da invasão de BMEC humanas, no entanto, não seria o único gene já que a sua deleção diminui mas não elimina o fenótipo de invasão. Esse gene tem apresentado uma prevalência entre 20-26 % em APEC (Ewers *et al.*, 2007).

Outra invasina já detectada em APEC é a proteína Tia (*toxigenic invasion locus*), descrita inicialmente em *E. coli* enterotoxigênica. Esta proteína influencia a adesão e a invasão de ETEC em células de cultura ileocecal humana e epitélio colônico (Fleckenstein *et al.*, 1996; Croxen e Finlay, 2010). Em APEC o gene *tia* está localizado na ilha de patogenicidade PAI I_{APEC-01}, a qual também possui o operon *pap* (Kariyawasam *et al.*, 2006). Em APEC é estimada uma prevalência entre 18-23% (Ewers *et al.*, 2007).

Outra invasina citada em ExPEC, *GimB* (*Genetic island associated with newborn meningitis*), consiste em uma ilha de patogenicidade contendo aproximadamente 5.200 pares de base. Ela é composta por seis ORFs (*Open Reading Frame*) relacionadas ao metabolismo do fosfato (GenBank AY170898.1). *GimB* é altamente prevalente em NMEC (55-66%) e está associada à manutenção dos altos níveis de bacteremia e ao processo de invasão da bactéria no tecido endotelial cerebral (Bonacorsi *et al.*, 2002). Já em APEC aparece em níveis mais baixos, entre 10-23% (Ewers *et al.*, 2007).

1.5.3 Colicina V

A colicina é uma substância antimicrobiana expressa por genes contidos em plasmídios ColV (gene *cvi/cva*, *Structural genes of colicin V operon*). Embora não esteja estabelecido se a própria colicina é ou não um fator de patogenicidade (Binns *et al.*, 1979), Zhao *et al.* (2009) observaram que a expressão de *cvi/cva* estava aumentada em modelo de infecção de galinhas, sugerindo que a ColV por si pode ser importante para o estabelecimento da doença. Muitas APEC (57-72%) possuem o plasmídeo que contém o gene da colicina V (Ewers *et al.*, 2007). Esse plasmídeo normalmente carrega outros genes ligados aos fatores de virulência, como genes para motilidade, resistência ao soro, sistemas de captura de ferro (sideróforos) e a adesina Tsh (La Ragione & Woodward, 2002; Dziva e Stevens, 2008). Em Dziva e Stevens (2008) que a transformação de uma cepa avirulenta de *E. coli* com um plasmídeo recombinante codificando a colicina V permitiu o aumento da colonização da bactéria na traqueia de galinhas.

1.5.4 Resistência ao soro

A resistência ao processo de lise e à opsonização pelo complemento também são considerados fatores de virulência em APEC (Vidotto *et al.*, 1990; Nolan *et al.*, 1992, 2003).

O gene cromossômico *ompA* (*Outer membrane protein*), codifica uma proteína da membrana externa produzida por *E. coli* e outras enterobactérias. Em NMEC desempenha papel importante de proteção à resposta imunológica do hospedeiro, bem como, juntamente com a fimbria tipo I, participa da adesão da bactéria ao macrófago e invasão do endotélio cerebral (Kim, 2008; Croxen e Finlay, 2010). A OmpA, presente na maioria dos isolados de APEC, possui as funções de adesina e invasina, participa da formação de biofilmes, age como um marcador imunológico e serve de receptor para vários bacteriófagos (Nolan *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007). Tem sido encontrada em 95-99% dos isolados de APEC (Ewers *et al.*, 2007).

A lipoproteína Iss, localizada na membrana externa da bactéria, apresenta propriedades contra o efeito do soro. Ela é codificada pelo gene *iss* (*increased serum survival*), encontrado no plasmídeo ColV. Acredita-se que a Iss previna a deposição do complexo de ataque à membrana, formado pelo complemento, por um mecanismo ainda desconhecido. O gene *iss* tem sido mais freqüente em APEC (82%) do que em isolados

comensais de aves (18%) (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005a). Quando comparada à cápsula K1 e ao lipopolissacarídeo, a proteína Iss tem uma ação inferior na resistência ao soro mas importante na virulência em geral da APEC (Mellata *et al.*, 2003; Tivendale *et al.*, 2004). Por outro lado, a resistência ao complemento pode ser necessária, mas não suficiente para explicar a instalação da doença (Dziva e Stevens, 2008).

Outro fator importante na resistência ao soro é a proteína codificada pelo gene *traT* (*Transfer Protein*), que pode estar presente no plasmídeo ColV ou em outros grandes plasmídeos. Assim como a Iss, a TraT é uma lipoproteína da membrana externa da bactéria. Foi demonstrado que a proteína TraT aumenta a sobrevivência das bactérias na presença do soro por impedir a opsonização pelo C3 e inibir a formação do complexo C5b6 (Dziva & Stevens, 2008).

A cápsula K1, composta por polissacarídeos de ácido polissialílico, é codificada pelo gene *neuC* (*K1 capsular polysaccharide*) e tem sido associada às infecções extra-intestinais. Ela tem função antifagocitária e permite a resistência ao soro. Em APEC, foi identificada como fator de virulência no isolado O2:K1 (La Razione & Woodward, 2002), enquanto em NMEC é considerada essencial para causar a meningite no recém-nascido, por proteger a bactéria da resposta imunológica do hospedeiro e da destruição no interior das células endoteliais (Kim, 2003).

Já os genes *kpsMT II* (*Group II capsule antigens*) codificam as proteínas KpsM, uma proteína de membrana, e KpsT, uma ATPase. Elas constituem o transportador ABC2, envolvido na exportação de polissacarídeos da membrana celular (Arecubieta *et al.*, 2000).

1.5.5 Sistemas de aquisição de ferro

A concentração de ferro livre no meio fisiológico animal não é suficiente para permitir o crescimento bacteriano. Muitas bactérias patogênicas desenvolveram, então, sistemas de alta afinidade para capturar o ferro. Esses sistemas competem com os sideróforos do hospedeiro, como as transferrinas, e permitem o crescimento bacteriano em locais de baixas concentrações de ferro (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999, Dziva & Stevens, 2008).

É conhecido um grande número de sistemas sideróforos em patógenos Gram-negativos. A habilidade da bactéria patogênica sequestrar o ferro dos fluidos do hospedeiro tem sido fundamental na virulência. Os sistemas de captura de ferro

juntamente com as adesinas (fimbria tipo 1 e Tsh), proteína de resistência ao soro (Iss) e o plasmídeo ColV têm sido considerados os fatores de virulência mais frequentemente associados com a APEC (Dozois et al., 2000; Ewers et al., 2007; Johnson et al., 2008a). Apesar das evidências de que as cepas patogênicas requerem sempre adesinas e pelo menos um sistema de captura de ferro (Caza et al., 2008), não está claro qual combinação específica é necessária para a virulência.

Em APEC, o sistema aerobactina é o sideróforo melhor caracterizado. Ele é codificado pelo operon composto pelos genes *iucABCD* e *iutA*, que geralmente estão em plasmídios ColV ou outros plasmídios (pAPEC-O2-ColV [NC_007675], pTJ100 [AY553855], pAPEC-O1-ColIBM [NC_009837], Vidotto et al., 1991; Johnson et al., 2006). O sistema aerobactina tem sido um dos VAGs mais frequentes entre isolados de septicemia e de celulite causadas por APEC em aves (Dozois et al., 2000; Ewers et al., 2007; Johnson et al., 2008; Brito et al., 2003).

Outro sistema de captura de ferro encontrado em APEC é o sistema salmoquelina. Ele é codificado pelos genes *iroBCDEN* (*catecholate siderophore salmochelin receptor*), os quais localizam-se em uma ilha de patogenicidade encontrada no plasmídeo ColV. Foi demonstrado que a expressão da proteína IroN é regulada de acordo com a concentração de ferro presente no meio e aumentada na presença de urina humana, fluido ascítico ou sangue, de acordo com a origem das respectivas cepas de *E. coli* utilizadas (Sorsa et al., 2003; Caza et al., 2008). Cepas de APEC mutantes para os sistemas aerobactina e salmoquelina tornaram-se avirulentas, incapazes de colonizar sítios extraintestinais de galinhas (Dozois et al., 2003). Caza et al. (2011), analisando a importância de cada gene dos sistemas da enterobactina e da salmoquelina, verificaram que os genes *entS* e *iroC*, da enterobactina e salmoquelina, respectivamente, responsáveis pela secreção do sideróforo, são primordiais para a virulência da cepa quando outros sideróforos não estão presentes.

O sistema transportador de ferro codificado pelo gene *sitABCD* (*Salmonella iron transport system gene*), é outro exemplo de sideróforo que pode ser encontrado tanto no cromossomo quanto no episssomo de APEC. O *sitABCD* codifica permeases (proteínas de membrana) que conferem à cepa APEC um aumento na multiplicação celular devido ao aumento na captura de ferro e manganês. O sistema *sit* também atua contra o estresse oxidativo, sendo possivelmente requerido durante a interação com fagócitos (Sabri et al., 2006; 2008).

Outros genes relacionados à aquisição de ferro pela bactéria são *fyuA* (*Ferric yersinia uptake - yersiniabactin receptor*) e *irp2* (*Iron repressible protein yersiniabactin synthesis*), descritos pela primeira vez em *Yersinia enterocolitica* e já encontrados em *E. coli* patogênica humano e em cepas APEC. O gene *fyuA* codifica uma proteína que atua na captação de ferro, e *irp2* codifica uma proteína reguladora de ferro (La Ragione & Woodward, 2002; Schubert *et al.*, 2002). A localização desses genes é cromossômica (Janssen *et al.*, 2001).

O sideróforo codificado pelo gene *chuA* (*Heme receptor gene - E. coli haem utilization*) foi detectado em uma investigação por STM (*signature-tagged mutagenesis*) de APEC O2 (IMT5155) em frangos, sugerindo seu envolvimento nos mecanismos de virulência (Li *et al.*, 2005).

O gene *ireA* (*Iron-responsive element*), identificado por Russo *et al.* (2001) em um isolado de UPEC, também está relacionado à captação de ferro. Sabe-se que *ireA* possui sua expressão aumentada na urina de humanos e contribui significativamente para a colonização da bexiga de camundongos (Russo *et al.*, 2001).

1.5.6 Toxinas Bacterianas

Muitas são as enzimas e toxinas produzidas pelas *E. coli*. Algumas estão relacionadas à exfoliação celular (EAEC, UPEC), invasão celular (EIEC) e desequilíbrio eletrolítico causando a diarreia (ETEC) (Croxen e Finlay, 2010). Serão abordadas brevemente aqui somente aquelas pesquisadas neste trabalho por PCR.

A toxina autotransportadora vacuolizante, produto do gene *vat* (*vacuolating autotransporter toxin*), induz a formação de vacúolos intracelulares, resultando em um efeito citotóxico similar aos efeitos causados pela toxina VacA de *Helicobacter pylori* (Parreira & Gyles, 2003). Esse efeito foi verificado em fibroblastos de embrião de pinto e em células renais de galinha infectados por APEC. Sabe-se que o gene *vat* está localizado em uma ilha de patogenicidade denominada VAT-PAI e que a toxina é secretada para o meio externo (Salvadori *et al.*, 2001).

A EAST1 (*heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative E. coli*), proteína codificada pelo gene *astA*, está localizada em um transposon e apresenta alta similaridade com a toxina estável ao calor de EAEC. Sabe-se que *astA* é amplamente distribuída entre diferentes categorias de *E. coli* patogênicas intestinais, tanto de humanos quanto de animais (Janssen *et al.*, 2001).

A hemolisina A, produzida por algumas bactérias Gram-negativas, foi descrita pela primeira vez em APEC por Nagai *et al.* (1998). Ela é codificada pelo gene *hlyA* (*Hemolysin A*), e secretada por um sistema de secreção do tipo I (Finlay e Falkow, 1997; La Ragione e Woodward, 2002). Concentrações sublétricas de hemolisina A produzida por UPEC levam à apoptose e exfoliação do epitélio do trato urinário. Em 625 APEC testadas Blanco *et al.* (1997) encontrou somente 2,6% de cepas produtoras de entero-hemolisina.

A toxina codificada pelo gene *cnf 1/2* (*Cytotoxic necrotizing factor*) está relacionada à formação de células gigantes, multinucleadas que levam à morte células Vero (De Rycke *et al.*, 1999). Em cepas NMEC ela é considerada uma invasina por participar ativamente no processo de penetração da bactéria em BMEC e na barreira hematoencefálica humana (Kim, 2008). O receptor para o CNF1 na célula hematoencefálica é a laminina. A toxina apresenta o domínio carboxi-terminal com atividade desaminase, a qual ativa a família das Rho-GTPases, envolvidas no rearranjo da miosina, importante na invasão da bactéria no tecido endotelial (Kim, 2008; Croxen e Finlay, 2010).

O gene *sat* (*secreted autotransporter toxin*), por sua vez, codifica uma proteína de 107 kDa, descrita pela primeira vez por Guyer *et al.* (2000). A Sat possui atividade serino-protease, e é citotóxica para células Vero (renais), HK-2 (de bexiga) e HEp-2 (epiteliais de laringe), sendo mais comumente expressa em isolados de UPEC de pacientes com pielonefrite (Guyer *et al.*, 2000). A Sat tem sido responsabilizada pelas lesões nas junções intercelulares e por aumentar a permeabilidade na região intestinal colonizada por DAEC (Croxen e Finlay, 2010).

Certas toxinas ainda não foram identificadas, somente o seu efeito observado, como é o caso do que foi verificado no trabalho de Blanco et al (1997), em 625 isolados de APEC, 7% apresentavam efeito citotóxico em HeLa mas não em células Vero, indicando apenas que não era uma toxina *Shiga-like*. Já em macrófagos de camundongo, linhagem J774, a APEC UEL17 induziu a apoptose nas células via caspase 3/7 (Bastiani *et al.*, 2005).

1.5.7 Outros fatores de virulência

Existem outros fatores de virulência, que não se enquadram nas descrições anteriores por apresentarem diferentes atividades. A proteína codificada pelo gene *pic*

(*Serine protease autotransporter*) foi originalmente identificada em cultura de *E. coli* enteroagregativa e possui atividade serino-protease (Heimer *et al.*, 2004).

Já as ilhas de patogenicidade *malX* (*Pathogenicity-associated island marker*), anteriormente consideradas apenas marcadores de patogenicidade, são atualmente consideradas contribuintes para a patogenicidade da septicemia aviária (Johnson *et al.*, 2005).

1.6 Sistema de Regulação da Virulência

A expressão da virulência bacteriana é regulada por um conservado sistema sensível às mudanças do ambiente, levando à adaptação. Um dos sistemas conhecidos em APEC é o BarAUvrY, o qual regula a virulência por inibir a expressão da fimbria tipo 1 e da Pap, pelo aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo e pela redução do nível de polissacarídeo na superfície (Herren *et al.*, 2006).

Tem sido observado, em experimentos *in vitro* e *in vivo*, que mutações no sistema de transporte específico de fosfato (pst), levam à uma ativação do regulador Pho, aumentando a sensibilidade da APEC ao soro, aos antimicrobianos, às variações de pH, a presença de peróxido de hidrogênio e reduzindo a expressão de genes envolvidos nos componentes de superfície celular como a fimbria tipo 1 (Crépin *et al.*, 2008; Bertrand *et al.*, 2010).

1.7 Componentes Celulares Receptores de Adesinas

As adesinas normalmente reconhecem diferentes componentes na superfície dos tecidos do hospedeiro, os quais podem servir como receptores no processo de adesão e/ou invasão celular. Na matriz extracelular, as adesinas podem reconhecer colágeno, laminina, elastina, proteoglicanos e hialurona; no plasma podem identificar as glicoproteínas vitronectina, fibrinogênio e fibronectina; e na membrana plasmática, integrinas, caderinas, selectinas e CEACAMs (Pizarro-Cerdá e Cossart, 2006).

2 JUSTIFICATIVA

A colibacilose tem causado grande prejuízo econômico na indústria aviária devido ao comprometimento no desenvolvimento da ave ou na produção de ovos, pela condenação da carcaça ou pela morte do animal. A manifestação mais grave da doença é a colissepticemia que, geralmente, inicia no trato respiratório superior, alcança a circulação sanguínea e atinge vários órgãos, podendo levar a morte da ave (revisado em Ferreira e Knöbl, 2000; Gyles e Fairbrother, 2010).

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar os fatores que favorecem a infecção por APEC e esclarecer melhor a patogenia da colibacilose. A colonização do trato respiratório é considerada uma etapa inicial crítica na patogênese da colissepticemia e a adesão um importante passo neste processo, porém ainda não totalmente esclarecida. Outro aspecto ainda desconhecido é a maneira pela qual a bactéria atinge a circulação sanguínea. Não está estabelecido como a bactéria vence a imunidade inespecífica e ultrapassa a barreira do epitélio. Já foi constatada a presença de bactéria no sangue em até 3 h após inoculação dos sacos aéreos (Pourbakhsh *et al.*, 1997a; Stordeur *et al.*, 2004). No entanto, não foi comprovado ainda se a bactéria entra via macrófagos ou por invasão dos tecidos e se esta invasão seria após um dano tecidual ou por indução da endocitose. Pourbakhsh *et al.* (1997c) ao analisar por microscopia eletrônica de transmissão os sacos aéreos de uma galinha inoculada com APEC, verificaram que a bactéria não só aderiu ao epitélio, mas também estava presente dentro de células epiteliais. Essa observação sugere que a colonização do epitélio respiratório pode ter como consequência a invasão das células epiteliais do hospedeiro. Sabe-se também que APEC são internalizadas por heterófilos e macrófagos e que sobrevivem intracelularmente nestas células por até 48 h (Mellata *et al.*, 2003), e que, portanto, esta poderia ser uma porta de entrada. Porém, até o presente trabalho pouca informação existia sobre a invasão de células não fagocíticas por APEC, o que motivou esta pesquisa.

A camada epitelial da mucosa, seja do trato respiratório ou gastrointestinal, forma uma importante barreira de proteção do hospedeiro e representa o primeiro sítio de contato para a bactéria. Para as cepas patogênicas atravessarem essa camada e terem acesso aos órgãos internos, elas precisaram desenvolver estruturas e mecanismos para aderir e invadir essa barreira (Vasquez-Torres e Fang, 2000). A invasão dos tecidos pode ser obtida por intermédio do efeito citotóxico (Roberts *et al.*, 2001; Kehl-Fie e Geme III,

2007); efeito apoptótico (Hilbi *et al.*, 1998; Jesenberger *et al.*, 2000; Denecker *et al.*, 2001; Thumbikat *et al.*, 2009); por intermédio de células fagocitárias, as quais transportam o patógeno internamente (Huang *et al.*, 2000); e por último, pelo uso de sistemas de invasão celular direto ou transversal. As ExPEC, como a NMEC e a UPEC, utilizam o mecanismo de invasão como uma das etapas do processo de infecção, e muitas das estruturas envolvidas na adesão bacteriana também estão envolvidas no processo de invasão (Kim, 2008; Thumbikat *et al.*, 2009; Kline *et al.*, 2009; Martinez e Hultgren, 2002).

A fimbria tipo 1 tem sido associada aos processos de adesão, invasão e apoptose em infecções por UPEC. A interação entre a adesina FimH da UPEC com uroplacina IIIa do epitélio da bexiga leva a eventos de fosforilação que estimulam uma via de sinalização, ainda desconhecida, causando invasão e apoptose (Thumbikat *et al.*, 2009). Outros receptores, como as integrinas $\alpha 3$ e $\beta 1$, também interagem com a FimH, causando o rearranjo do citoesqueleto, engolfamento e internalização da bactéria aderida na célula epitelial do trato urinário (Martinez e Hultgren, 2002; Eto *et al.*, 2007).

Em NMEC a penetração da barreira hematoencefálica humana tem sido mediada pela ligação das proteínas IbeA, FimH, OmpA e CNF1 a receptores da célula eucariótica (Kim, 2008). Na superfície das células endoteliais dos microvasos cerebrais, a adesão é mediada pela fimbria do tipo I ao CD48, e pela OmpA ao receptor ECGP96 (Croxen e Finlay, 2010, Khan *et al.*, 2007). Assim, FimH e OmpA estariam envolvidas no rearranjo do citoesqueleto de actina, enquanto o CNF1 estaria envolvido no rearranjo da miosina, proporcionando a invasão da bactéria no tecido endotelial (Kim, 2008; Croxen e Finlay, 2010).

Segundo Germon *et al.* (2005), o gene *ibeA* (*Invasion of brain endothelium*) poderia ter função similar em cepas de APEC (sorogrupo O2), permitindo a penetração da bactéria em células aviárias. A ilha de patogenicidade *gimB* (*Genetic island associated with newborn meningitis*) é outro fator relacionado à invasão e que pode ser encontrada em APEC. É uma região no DNA associada aos isolados de NMEC, sendo envolvida na manutenção dos altos níveis de bacteremia característicos da meningite (Bonacorsi *et al.*, 2002).

Neste contexto, este trabalho objetivou verificar o comportamento da APEC ao infectar células não fagocitárias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o comportamento de cepas de APEC ao infectar células não fagocitárias.

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Verificar a capacidade de associação, invasão, multiplicação intracelular, citotoxicidade e habilidade em ativar as caspases 3/7, de cepas APEC quando infectando fibroblastos aviários;
- 2- Caracterizar o genótipo dos fatores de virulência das cepas bacterianas usadas para o estudo;
- 3- Associar o fenótipo de adesão e invasão das APEC à presença de adesinas e invasinas;
- 4- Analisar a capacidade de associação, invasão e multiplicação intracelular de cepas de APEC em células endoteliais humanas;
- 5- Caracterizar o patotipo APEC pela análise da expressão dos genes de virulência;
- 6- Estudar a expressão dos genes *fimH*, *ompA*, *ibeA* e *gimB* em uma cepa invasiva e em uma cepa não invasiva quando em contato com fibroblastos aviários.

4 RESULTADOS

4.1 AVIAN PATHOGENIC *Escherichia coli* MT78 INVADES CHICKEN FIBROBLASTS

4.1.1 Introduction

4.1.2 Materials and Methods

4.1.2.1 Bacterial strains

4.1.2.2 Chicken fibroblast cell line CEC-32

4.1.2.3 Determination of bacterial association to fibroblasts

4.1.2.4 Analysis of viability of internalized bacteria and intracellular bacterial growth (gentamicin protection assay)

4.1.2.5 Confocal microscopy of internalized MT78

4.1.2.6 Cell cytotoxicity assay

4.1.2.7 Analysis of caspase-3/7 activation

4.1.2.8 Virulence genotyping

4.1.2.9 Statistical analysis

4.1.3 Results

4.1.3.1 Bacterial association, invasion and intracellular viability

4.1.3.2 Cytotoxicity and caspase-3/7 induction by APEC

4.1.3.3 Genes related to adhesion and invasion

4.1.4 Discussion

4.1.5 Conclusion

4.1.6 References

4.2 AVIAN PATHOGENIC *Escherichia coli* STRAINS ADHERE TO BUT DO NOT INVADE HUMAN UMBILICAL ENDOTHELIAL CELLS

Leticia B. Matter ^(1,2), Roberta Reis ⁽¹⁾ and Fabiana Horn ⁽¹⁾

¹Departamento de Biofísica, Laboratório de Microbiologia Celular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS, Porto Alegre, RS

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

4.2.1 Introduction

Avian pathogenic *E. coli* (APEC) is a member of the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) group, which includes uropathogenic *E. coli* (UPEC) and neonatal meningitis *E. coli* (NMEC). APEC is responsible for localized or systemic avian infections, affecting poultry industries economy (Kaper *et al.*, 2004; Dziva and Stevens, 2008).

Characterization of ExPEC strains using various typing methods, phylogenetic and comparative genomic studies, virulence-factor pattern analysis and serotyping, have shown close relationships between ExPEC strains of human and avian origin (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Moulin-Schouleur *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2007). These observations raise the hypothesis that there is no host dependence in these different ExPEC pathotypes. Tivendale *et al.* (2010) tested APEC and NMEC in meningitis and avian colisepticemia models and showed that some strains were able to cause both infections, providing support for that hypothesis. In addition, Bauchart *et al.* (2010) verified that APEC displays a similar transcriptional profile at human (37 °C) and avian (41 °C) temperatures. Recently, Peigne *et al.* (2009) have shown that a virulent NMEC strain harbors a large plasmid with high homology to APEC plasmids (pAPEC-O2-ColV and pAPEC-O1-ColBM). These evidences suggest that poultry may be a reservoir for human ExPEC strains; alternatively APEC may contribute as a reservoir for virulence-associated genes of human ExPEC.

The capacity of NMEC to invade human brain microendothelial cells (HBMEC) is central for its virulence and establishment of meningitis; in contrast NMEC is unable to invade the closely related human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (Prasadaráo *et al.*, 1996). The APEC strain BEN2908 also invades HBMEC (Germon *et*

al., 2005) but nothing is known about APEC-HUVEC interaction. To gather more knowledge on the similarity between APEC and NMEC, we examined the association profiles, invasiveness and intracellular surviving of APEC strains in human umbilical endothelial cells.

4.2.2 Materials and Methods

4.2.2.1 Bacterial Strains

The avian pathogenic *E. coli* (APEC) strains used in this work, and the adhesion genes they present, are shown in Table 1. All strains were isolated from cases of septicemia in chickens and represent different phylogenetic lineages as well as different geographic origins (Brazil, Germany, USA and France). Strain IMT5104, isolated from feces of a clinically healthy chicken (A_{fecal}) and *E. coli* K-12 (DH5 α) were also tested for comparative purposes.

Strains were maintained in glycerol stocks at -80° C. For the experimental procedures, bacteria were seeded on Luria Bertani (LB) agar plates overnight at 37 °C; one colony was grown in 5 ml of LB broth until the stationary-phase (overnight at 37 °C). Two hundred μ l of this inoculum were diluted in 20 ml of fresh LB broth and bacteria grown at 37° C under 150-180 rev/min until the culture reached an OD₆₀₀ corresponding to about 2×10^8 CFU (colony forming units)/ml. Bacteria were harvested by centrifugation at 4,000 g for 10 min at 4 °C, resuspended in endothelial cells culture medium (see below) and used in the experiments.

Table 1. Bacteria adhesins repertory

Strains	Genes for adhesins							Reference
	<i>Afa/draB</i> ; <i>iha</i> ; <i>sfa/focCD</i>	<i>csg</i>	<i>fimC</i>	<i>hrlA/hek</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	<i>mat</i>	
K12	-	+	+	-	-	-	-	Matter <i>et al.</i> , 2011
UEL13	-	+	+	+	-	-	-	Matter <i>et al.</i> , 2011
UEL17	-	+	+	+	-	-	+	Matter <i>et al.</i> , 2011
UEL29	-	+	+	+	-	-	-	Matter <i>et al.</i> , 2011
UEL31	-	+	+	-	-	-	+	Matter <i>et al.</i> , 2011
IMT5104	-	+	-	-	-	-	+	Li <i>et al.</i> , 2005
IMT5155	-	+	+	-	-	+	+	Antão <i>et al.</i> , 2008
IMT2470	-	+	+	+	+	+	+	Matter <i>et al.</i> , 2011
A2363	-	+	+	-	-	+	+	Matter <i>et al.</i> , 2011
MT78	-	+	+	+	-	-	-	Matter <i>et al.</i> , 2011

4.2.2.2 *Human Endothelial Cell line EAhy926*

A stable transfected human umbilical endothelial cells (HUVEC EAhy926 line) kindly donated by Dra. Cora-Jean S. Edgell (University of North Carolina, EUA) was used as a non-phagocytic cell to test APEC-endothelial cell interactions. Endothelial cells were cultivated in DMEM cell culture medium (Dulbecco's modified Eagles medium - Gibco, Grand Island, NY), 10% of fetal calf serum (FCS, Gibco, Grand Island, NY), 2 mM of glutamine, 1% of HAT (Hipoxantina/Aminopterina/Timidina), at 37 °C and 5% of CO₂ (Edgell *et al.*, 1983).

4.2.2.3 *Determination of bacterial association to endothelial cells*

In order to verify the association profile of APEC to EAhy cells, cells (3.0×10^4 cell/well) were plated onto 96-well plate in cell culture medium. When confluent, cells were infected. Before infection, cells were counted to estimate the cell number per well. Cells were then washed once with PBS (phosphate buffered saline) and infected with APEC strains at a multiplicity of infection (MOI) of 20 bacteria per cell in cell culture medium. After 1 h of incubation (at 37 °C and 5% of CO₂), the medium was removed, cells were washed three times with PBS and lysed with Triton X-100 (Sigma, Steinheim, Germany) 1 % (v/v) for 5 min at room temperature and serial dilutions in PBS were plated on LB agar for CFU determination. The experiment was done three times in quadruplicates for each strain.

4.2.2.4 *Analysis of internalized bacteria and intracellular bacterial growth (gentamicin protection assay)*

In order to quantify the number of viable internalized bacteria, EAhy926 cells were plated and infected in the same way as described for the association assay. After 1 h of infection, cells were washed three times with PBS and reincubated with cell culture medium containing 50 µg ml⁻¹ of gentamicin for another 3 h and 23 h. After this time, cells were washed once with PBS and lysed with Triton-X 100 1 % for 5 min at room temperature, diluted in PBS and plated on LB agar for CFU determination. The experiment was done three times in quadruplicates for each strain.

4.2.2.5 *Scanning Electronic Microscopy (SEM)*

For scanning electron microscopy, CEC-32 and EAhy926 cells were plated over coverslips on a 24-well plate and infected for 1 h; cells were then washed three times with PBS

and fixed with 2.5 % glutaraldehyde (in PBS) for one week. Coverslips were washed in PBS and dehydrated in an ascending series of acetone solutions (30% - 100%), critical point dried by the CO₂ and coated with a layer of gold. Visualization of samples was carried out in a JSM 6060 scanning electron microscope at 10 KeV and 20 KeV accelerating voltage.

4.2.2.6 *Fimbriae genotyping*

Avian *E. coli* strains were examined for the presence of genes for five fimbriae (F4, F5, F6, F18 and F41), using multiplex PCR as previously described (Costa *et al.*, 2006). Bacterial DNA was prepared from whole organisms (cultured overnight in LB agar at 37 °C) by the boiling method. The amplicons were: F4 (499 pb), F5 (230 pb), F6 (520 pb), F18 (313 pb) e F41 (613 pb).

4.2.2.7 *Statistical Analysis*

Results are presented as average with standard deviations. Statistical testing was done by using Prism Package (version 5.0). Multiple comparisons were calculated with Tukey's test considering P value < 0.05 for statistical significance.

4.2.3 **Results**

4.2.3.1 *Cell association*

In order to verify the association capacity of APEC to human umbilical endothelial cells, cells were infected for 1 h and the extracts were plated on LB agar for CFU counting. As shown in Fig. 1, all strains associated to endothelial cells, with some APEC strains having a higher capacity to adhere than others. Interestingly, the number of IMT5104 (*A_{fecal}*) bacteria associated to EAhy cells did not differ statistically from other APEC strains, even though IMT5104 contains only two known adhesin genes (*crl* and *mat*) (Table 1).

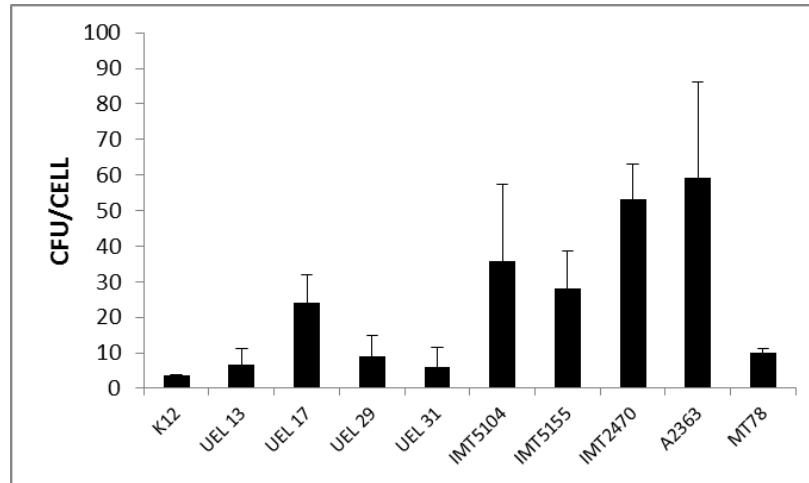


Figure 1. Association profile of APEC, K12 and A_{fecal} (IMT5104) to EAhy endothelial cells after 1 h of infection. Only strains IMT2470 and A2363 differ statistically from K12, while A2363 differs also from APECs UEL29, UEL31, UEL13, MT78 ($P < 0.05$).

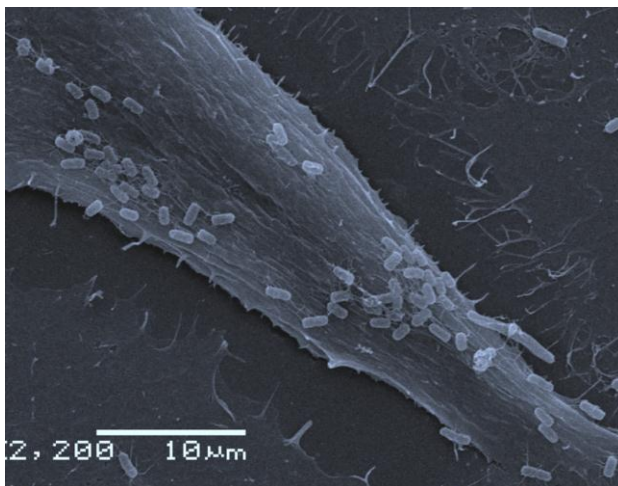


Figure 2. SEM of APEC strain A2363 adhering to EAhy endothelial cells after 1 h of infection (MOI 20).

Strain A2363 presented a high adherence capacity to human endothelial cells (Figure 2), 12 times more than to avian fibroblast cells (Matter *et al.*, 2011).

4.2.3.2 Fimbriae genotyping

The fact that IMT5104 has only two adhesins and an association profile like APEC moved us to investigate the presence of fimbria other than the ones usually associated with ExPEC. Thus, we looked for fimbria F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18 (F107) e F41, which are usually present in ETEC, and are responsible for bacterial adherence to mammalian intestinal epithelium (Gyles and Fairbrother, 2010). In ETEC, F4 and F18 are considered the predominant fimbrial adhesin and are associated with

postweaning disease in pigs (Post *et al.*, 2000). Table 2 shows the prevalence of the fimbriae genes detected by PCR in the strains used in this work.

Table 2. Bacteria adhesins repertory

Strains	Adhesins				
	F4	F5	F6	F18	F41
K12	+	-	-	-	+
UEL13	+	-	-	-	+
UEL17	+	-	-	-	+
UEL29	+	-	-	-	+
UEL31	+	-	-	-	+
IMT5104	+	-	-	-	+
IMT5155	+	-	-	+	+
IMT2470	-	-	-	-	+
A2363	+	-	-	+	+
MT78	+	-	-	+	+

4.2.3.3 Scanning Electronic Microscopy

Scanning electron micrographs of APEC infecting endothelial cells revealed the presence of fibers extending micrometers away from the surface of the bacilli. The fibers looked like they are binding bacteria together and helping them to adhere to the endothelial cell surface (Figure 3A). They are peritrichious fibers, not having a specific place over the bacterium body. These filamentous appendages were also evident on the bacteria adhering to avian fibroblast cell surface (Figure 3B), and even on the bacteria growing in LB broth (Figure 4) despite in a lower amount. It was also possible to observe a reduction in the number of appendages in MT78 strain when invading fibroblast cells (Figure 3C and 3D). Analyzing the pictures more closely we could see the appendages of A2363 strain getting into the cell surface (Figure 5 and *anexo E*).

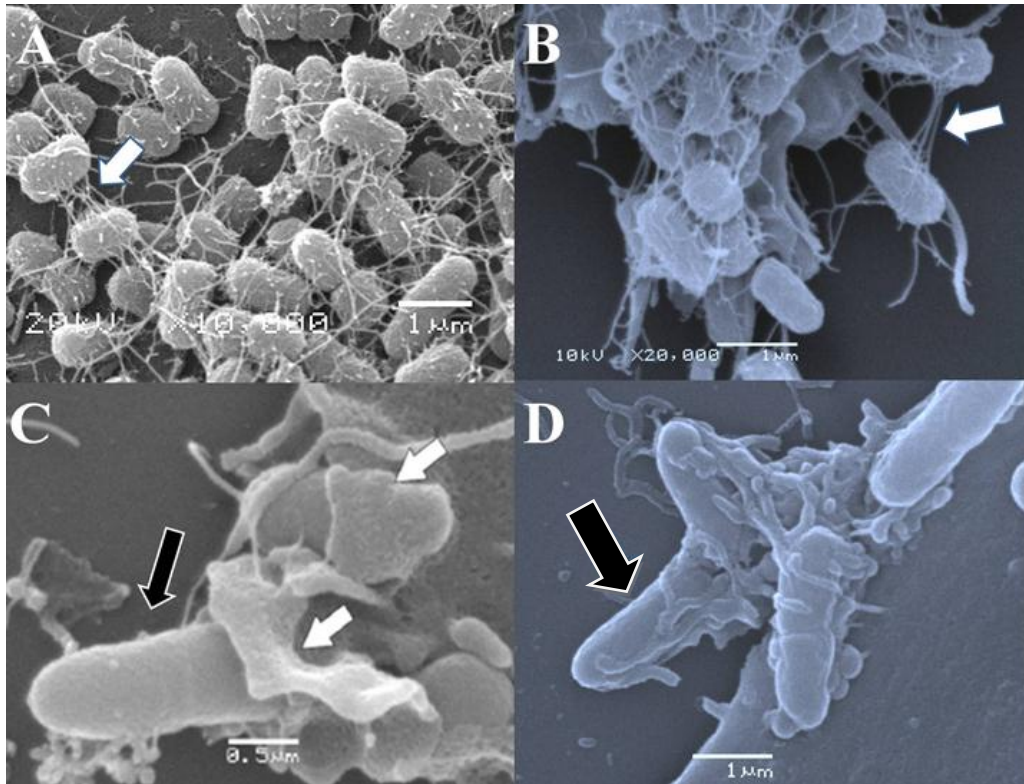


Figure 3. Appendages of APEC MT78 observed by SEM. (A) MT78 strain adhering to EAhy926 endothelial cells after 1 h of infection (MOI 200). Appendages are indicated by white arrows. (B) MT78 strain adhering CEC-32 cells after 1 h of infection (MOI 20). Appendages are indicated by white arrows. (C) and (D) MT78 strain invading CEC-32 cells after 1h of infection (MOI 20). Black arrows indicate the bacterium and white arrows the involving eukaryotic cell.

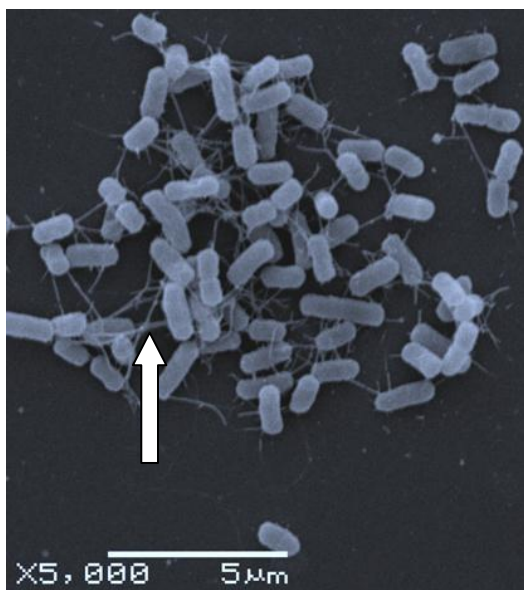


Figure 4. Appendages of MT78 strain grown in LB broth during ~2 h at 37 °C (180 rev/min) observed by SEM. White arrow indicates the appendages.

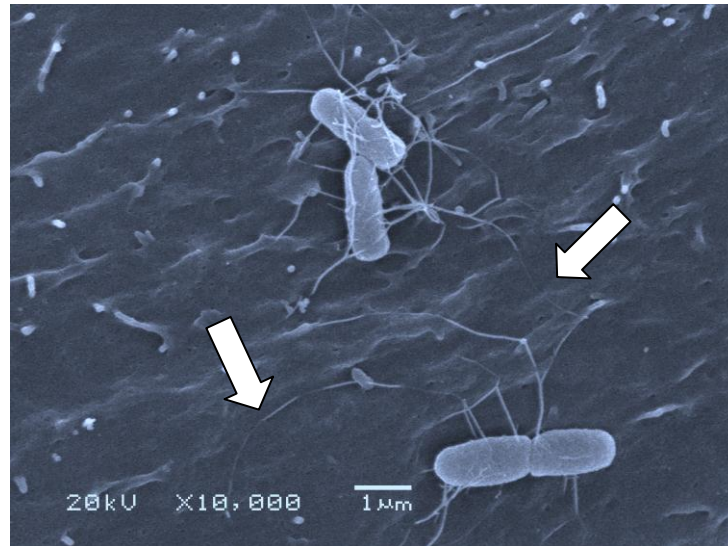


Figure 5. Appendages of A2363 strain getting into EAhy926 endothelial cells, seen by SEM. Cells were infected for 1 h (37 °C) at MOI 20. Appendages are indicated by white arrows.

4.2.3.4 Invasion and intracellular bacterial viability

To investigate the invasiveness and intracellular viability of bacteria, endothelial cells were infected for 1 hour, treated with gentamicin for 3 and 23 h, lysed and the extracts plated on LB agar.

Fig. 6 shows that virtually no bacteria could be recovered from inside the endothelial cells at 4 h p.i. (black bars), and the number of internalized viable bacteria at 24 h p.i (white bars) was even lower for most strains. The only strain that had higher numbers of intracellular viable bacteria at 24 h p.i. was strain MT78 (136%, taking the number of internalized bacteria at 4 h as 100 %, although without statistical significance). Thus, the APEC strains did not invade nor multiply within human endothelial cells. The same assay was carried out with *Salmonella* Typhimurium SL1344, which increased 509% after 24 h of incubation (which was significantly different of 4 h, $P < 0.05$).

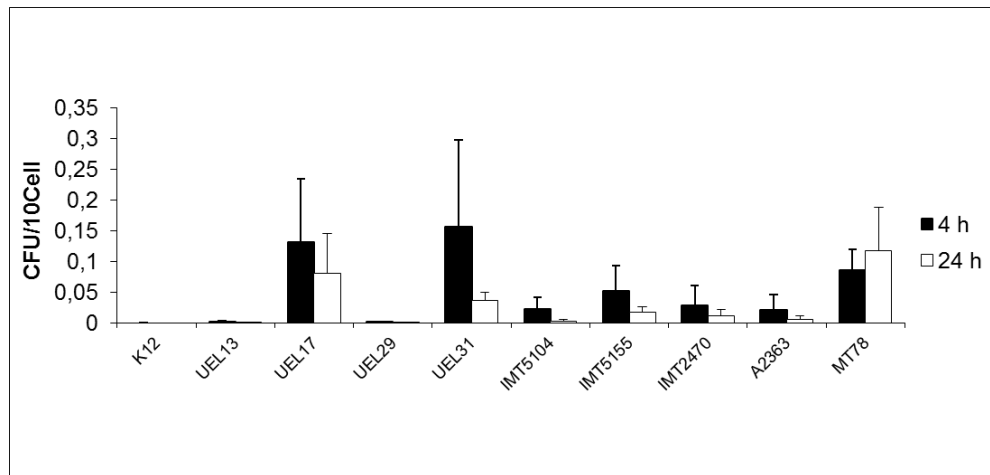


Figure 6. Gentamicin-resistance assay of APEC in EAhy926 endothelial cells after 4 (black bars) and 24 h (white bars) p.i. Data represent the average of at least 3 experiments. Values do not differ statistically for both times.

4.2.4 Discussion

Bacterial adherence to host tissues is a complex process that, in many cases, involves the participation of several distinct adhesins, which may act at the same time or at different times/stages during infection. *E. coli* appendages, such as fimbriae, usually facilitate the initial attachment to cells and subsequent successful colonization of the tissue (Dziva and Stevens, 2008).

In this work, association assays showed that APEC pathotype has affinity to human endothelial cells since a high adhesion was observed, greater than observed for avian fibroblast cells (Matter *et al.*, 2011). Strains UEL17, A2363, IMT5155, IMT5104 and IMT2470 adhered five to fourteen times more to human endothelial than to avian fibroblast cells (adhesion results with endothelial and fibroblasts cells differ statistically to strains A2363 and IMT2470, $P < 0.05$). Fimbriae genotyping (Tables 1 and 2) did not explain the high association results for A2363 and IMT2470 or even for fecal strain IMT5104.

Chanteloup *et al.* (2011) had already observed that BEN2908, a Nal^R derivative of MT78, adhered similarly to both human pneumocytes and avian hepatocytes. Since adherence is the first step for tissue colonization, the high adhesion to human endothelial cells observed here may be associated with a zoonotic risk of APEC, already suggested in many works.

By SEM we observed filamentous appendages that resemble *E. coli* common pilus (ECP), usually found in ETEC, EHEC (0157:H7) and commensal *E. coli* when infecting epithelial cells (Rendón *et al.*, 2007, Blackburn *et al.*, 2009). ECP is important

for bacteria to adhere to cell surfaces because an *ecpA* mutant of EHEC became deficient in adhering to epithelial cells (Blackburn *et al.*, 2009). This gene is the same as *mat* in ExPEC. However, strains UEL13, UEL29 and MT78 were negative for this gene by PCR (Table 1). Nevertheless it is possible that the lack of amplification of *mat* was due to some nucleotide alteration in the sequence of this gene, and not the lack of the gene itself (Rendón *et al.*, 2007; Blackburn *et al.*, 2009). Immunofluorescence against specific structures like curli, ECP and type 1 fimbria would help to identify the nature of these filamentous appendages of APEC.

In relation to the invasion ability, no strain was capable of invading human endothelial cells (Figure 6). Strain MT78, which displayed an invasive phenotype in fibroblast cells (1.4 CFU/10 cells), was unable to invade human umbilical endothelial cells (0.08 CFU/10 cells). This fact could be explained by dependence on a host species-specific interaction. However strain BEN2908 invaded human Brain Microvessel Endothelial Cells (2.5%; percentage of invasion defined as [100 x (no. of intracellular bacteria recovered)/(no. of bacteria inoculated)]) and human type II pneumocytes (0.75%) at levels comparable to invasion of CEC-32 avian fibroblasts (0.75%) (Germon *et al.*, 2005; Chanteloup *et al.*, 2011; Matter *et al.*, 2011), suggesting that the invasion capacity is rather cell-specific instead of host species-specific. In agreement with that interpretation, Chanteloup *et al.* (2011) observed that 23% of BEN2908 invaded avian hepatocytes, showing that even in the same species there exist different levels of invasion. Altogether, these results suggest that MT78 strain (APEC K1) behaves like NMEC K1 strains, only invading HBMEC and not systemic endothelial cells (HUVEC) (Prasadaráo *et al.*, 1996).

The reason for the lack of invasion of NMEC K1 in HUVEC is the unavailability of GlcNAc β 1-4GlcNAc moieties in the glycoprotein of HUVEC cells, which are present in BMEC and allow OmpA binding (Prasadaráo *et al.*, 1996). For the authors, OmpA interaction with GlcNAc β 1-4GlcNAc epitopes may be a key step for the invasion of *E. coli* into BMEC.

4.2.5 Conclusion

This work pointed out two important results that reinforce the idea of a close relationship between APEC and human ExPEC, more specifically NMEC. The first one is in respect to the high affinity to systemic human endothelial cells, represented by high adhesion capacity of some APEC strains, what is relevant since adhesion is the first step

for tissue colonization. The second one is in relation to the negligible invasion in HUVEC what is also characteristic of human NMEC.

4.2.6 References

- BAUCHART, P., GERMON, P., BRÉE, A., OSWALD, E., HACKER, J. and DOBRINDT, U. Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli* – search for factors involved in host specificity or zoonotic potential. *Microbial Pathogenesis*. 49:105-115, 2010
- BLACKBURN, D., HUSBAND, A., SALDANHA, Z., NADA, R. A., KLENA, J., QADRI, F. and GIRON, J. A. Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of Human Enterotoxigenic *E. coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 47, 6: 1781–1784, 2009
- CHANTELOUP, A., PORCHERON, G. L., DELALEU, B.B, GERMON, P. A, SCHOULER, C. A. MOULIN-SCHOULEUR, M. A and GILOT, P. The extra-intestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 invades avian and human epithelial cells and survives intracellularly. *Vet Microbiol.* 27; 147 (3-4):435-9, 2011.
- COSTA, M. M., SILVA, M. S., SPRICIGO, D. A., WITT, N. M., MARCHIORO, S. B., KOLLING, D. A., VARGAS, A. P. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos de sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 26 (1): 5-8, 2006.
- 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.
- EDGEELL, C-J, MCDONALD, C.C and GRAHAM, J. B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 80:3734-3737, 1983.
- 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.
- 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.
- GYLES, C. and FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli* in: GYLES, C., PRESCOTT, J. F., SONGER, J. G. and THOEN, C. O. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Wiley-Blackwell Ed, Iowa, USA

- JOHNSON, T. J., KARIYAWASAM, S., WANNEMUEHLER, Y., MANGIAMELE, P., JOHNSON, S. J., DOETKOTT, C., SKYBERG, J. A., LYNNE, A. M., JOHNSON, J. R. & NOLAN, L. K. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *Journal of Bacteriology*, 189 (8): 3228-3236, 2007.
- KAPER, J. B., NATARO, J. P. & MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*, 2: 123-140, 2004.
- KIM, K. S. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier *Nature Reviews Microbiology*, 6: 625-634, 2008.
- LI, G., LATURNUS, C., EWERS, C. & WIELER, L. H. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun*, 73: 2818-2827, 2005.
- MATTER, L.B., BARBIERI, N.L., NORDHOFF, M., EWERS, C. & HORN, F. Avian Pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken fibroblasts. *Vet Microbiol* 24;148 (1):51-9, 2011.
- MOULIN-SCHOULER, M., SCHOULER, C., TAILLIEZ, P., KAO, M., BRÉE, A., GERMON, P., OSWALD, E., MAINIL, J., BLANCO & M., BLANCO, J. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (10): 3484-3492, 2006.
- PEIGNE, C., BIDET, P., MAHJOUR-MESSAI, F., PLAINVERT, C., BARBE, V., ME'DIGUE, C., FRAPY, E., NASSIF, X., DENAMUR, E., BINGEN, E. AND BONACORSI, S. The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *e. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. *Infection and Immunity*, 77 (6): 2272-2284, 2009.
- POST, K. W., BOSWORTH, B. T. AND KNOTH, J. L. Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea and edema disease in North Carolina. *Swine Health and Production*, 8 (3) 119-120, 2000.
- PRASADARAO, N. V., WASS, C. A., and KIM, K. S. Endothelial Cell GlcNAc1-4GlcNAc Epitopes for Outer Membrane Protein A Enhance Traversal of *Escherichia coli* across the Blood-Brain Barrier *Infection and Immunity*, 64 (1): 154-160, 1996.
- RENDON, M. A., SALDAÑA, Z., ERDEM, A. L., MONTEIRO-NETO, V., VAZQUEZ, A., KAPER, J., PUENTE, J. L. and GIRON, J. A. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *PNAS*, 104 (25): 10637-10642, 2007.
- RODRIGUES-SIEK, K. E., GIDDINGS, C. W., DOETKOT, C., JOHNSON, T. J., FAKHR, M. K. & NOLAN, L. K. Comparison of *Escherichia coli* isolates

implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, 151: 2097-2110, 2005.

TIVENDALE, K. A., LOGUE, C. M., KARIYAWASAM, S., JORDAN, D., HUSSEIN, A., LI, G., WANNEMUEHLER, Y. and NOLAN, L. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infection and Immunity*, 78 (08): 3412-3419, 2010.

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.

4.3 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE *ibeA* E *gimB* NA INTERAÇÃO ENTRE *Escherichia coli* PATOGENICA AVIÁRIA INVASIVA E FIBROBLASTOS AVIÁRIOS

Letícia Beatriz Matter ^(1,2), Agueda Vargas ⁽³⁾ e Fabiana Horn ⁽¹⁾

¹PPG em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; ²Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Santo Ângelo, RS; ³ Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

RESUMO

A colisepticemia é uma das manifestações extraintestinais mais graves causadas pela *Escherichia coli* patogênica aviária e que normalmente inicia pela infecção das vias aéreas da ave. O conjunto de genes associados à virulência, que caracteriza este patotipo, e os mecanismos moleculares responsáveis pela patogênese ainda permanecem não elucidados. Em trabalho anterior, verificamos que algumas cepas APEC apresentaram capacidade de invadir fibroblastos aviários, o que pode ser um dos mecanismos usados por algumas cepas para acessar a circulação sanguínea da ave. No mesmo trabalho, verificamos que a cepa invasiva MT78 apresenta um perfil de genes associados à virulência (VAGs) semelhante ao de cepas não invasivas, como a IMT2470. Neste trabalho analisamos a expressão dos VAGs das cepas APEC MT78 e IMT2470 durante a infecção de fibroblastos aviários CEC-32 por 3 h, a fim de identificar quais os fatores de virulência importantes para o fenótipo invasivo da cepa MT78. A análise da expressão dos VAGs, por RT-PCR, mostrou a expressão de três grupos de genes associados à virulência: adesinas (*crl*, *fimC* e *hrlA*); sideróforos (*chuA*, *ireA*, *iroN* e *iucD*) e protectinas/estruturas de resistência ao soro (*iss*, *neuC*, *kpsMTII*, *ompA* e *traT*); em ambas as cepas, tanto na presença quanto na ausência de fibroblastos. A presença de genes para vários sistemas de aquisição de ferro, mas somente a expressão de alguns (*chuA*, *ireA*, *iucD*, *iroN*) supõe uma grande plasticidade do patotipo, sugerindo que o mesmo possui muitos mecanismos alternativos ou compensatórios de virulência nos diferentes estágios de infecção. Por outro lado, a técnica RT-PCR não apresentou sensibilidade suficiente para detectar diferenças na expressão que explicasse o fenótipo de invasão da cepa MT78. A análise, porém, por RT-qPCR, da expressão de *fimH*, *ompA*, *ibeA* e *gimB*, genes responsáveis pela invasão de NMEC em células endoteliais cerebrais humanas (HBMEC), mostrou a repressão do gene *fimH* na MT78, mas indução do mesmo na IMT2470. Já as invasinas *gimB* e *ibeA* apresentaram-se induzidas na

MT78 e reprimidas na IMT2470, enquanto o gene *ompA* encontrava-se expresso em ambas as cepas. A transcrição do gene *fimH*, adesina da fimbria tipo 1, apresentava-se reprimida na cepa invasiva, provavelmente pelo fato da bactéria encontrar-se em processo de invasão, não sendo mais necessária a síntese da mesma. Assim, a cepa invasiva estaria direcionando a sua energia à síntese de invasinas, visto estas estarem em níveis aumentados na cepa. Para concluir, a análise da expressão sugere a participação dos genes *gimB* e *ibeA* no processo de invasão da cepa MT78.

4.3.1 Introdução

A colibacilose é uma doença que se manifesta de maneira localizada ou sistêmica na ave, e tem sido associada a perdas econômicas na indústria aviária. Seu agente etiológico é a *Escherichia coli* patogênica aviária, patotipo pertencente ao grupo das ExPEC (*Escherichia coli* patogênica extraintestinal) (Dziva e Stevens, 2008).

Apesar das investigações e dos avanços feitos em relação aos fatores determinantes para a virulência de cepas de APEC, atualmente não se tem um consenso sobre quais são as características indispensáveis para o patógeno causar colibacilose, conhecimento que permitiria buscar alternativas mais eficientes de controle da doença. Diversas cepas patogênicas têm sido isoladas de aves doentes com o objetivo de caracterizar o patotipo por meio da genotipagem dos genes associados à virulência (VAGs), bem como de entender a patogênese. No entanto, o que se observa é que não existe um fator específico ou um conjunto de fatores identificados que caracterizem o patotipo, inclusive dentro do mesmo sorogrupo existe uma grande variabilidade (Tivendale *et al.*, 2010; Ewers *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2009).

A mais grave manifestação da colibacilose é a septicemia, que inicia no trato respiratório superior e progride, alcançando os órgãos vitais. A colonização do trato respiratório é considerada um passo inicial crítico na patogênese da septicemia aviária. Em trabalho anterior, mostramos a capacidade que certas cepas de APEC possuem em aderir a fibroblastos aviários (CEC-32), sendo que a cepa MT78 foi capaz de invadí-los em níveis comparáveis à bactéria invasiva *Salmonella* Typhymurium SL1344, sugerindo fortemente a possibilidade deste ser o mecanismo utilizado por algumas cepas APEC para acessar a corrente sanguínea da ave (Matter *et al.*, 2011). A cepa invasiva MT78 apresenta um perfil de VAGs semelhante ao de cepas não invasivas, como o da IMT2470. A cepa MT78 também é conhecida por invadir células endoteliais cerebrais

humanas (Germon *et al.*, 2005) e tem sido associada a risco zoonótico (Chanteloup *et al.*, 2011; Bauchart *et al.*, 2010).

Neste contexto, este trabalho estudou a expressão dos VAGs das cepas de APEC MT78 e IMT2470 durante a infecção de fibroblastos aviários CEC-32, a fim de caracterizar os fatores de virulência importantes para a APEC, e assim procurar explicar o fenótipo invasivo da MT78.

4.3.2 Materiais e Métodos

4.3.2.1 Células

Fibroblastos aviários, linhagem CEC-32 (“chicken embryo cells”), foram utilizados como células não fagocitárias no ensaio de associação entre bactéria e célula eucariótica, conforme descrito em Matter *et al.*, 2011. Essas células foram gentilmente cedidas pelo Prof. Bernd Kaspers (Universidade de Munique, Alemanha).

A linhagem CEC-32 foi escolhida por ser uma célula não fagocitária de origem aviária, a qual simula mais fielmente o ambiente que a bactéria irá encontrar *in vivo*. As células foram cultivadas em DMEM (Dulbecco’s modified Eagles medium, Gibco, Grand Island, NY) com 10% de soro fetal bovino inativado (65°C/30 min) (SFB - Gibco, Grand Island, NY) e 2 mM de glutamina, e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂.

4.3.2.2 Cepas Bacterianas

As cepas APEC utilizadas neste estudo foram: MT78 (O2:K1:H7) (Bauchart *et al.*, 2010; Dho-Moulin *et al.*, 1982) e IMT2470 (O2:H5) (Ewers *et al.*, 2005). Dentre 33 VAGs testados, ambas MT78 e IMT2470 apresentaram no genoma as adesinas *crl*, *fimC* e *hrlA/hek*, as invasinas *gimB* e *ibeA*, os sideróforos *chuA*, *fyuA*, *ireA*, *iron*, *irp2*, *iucD*, *sitD chr.* e *sitD ep.*, as protectinas/estruturas de resistência ao soro *iss*, *neuC*, *kpsMT II*, *ompA* e *traT*, e o marcador de ilha de patogenicidade CFT073 (*malX*); a IMT2470 se distingue da MT78 por apresentar as toxinas *astA* e *vat*, ausentes na MT78. No entanto, a cepa MT78 invade fibroblastos aviários em níveis comparáveis a *Salmonella* Typhymurium SL1344, enquanto a IMT2470 não invade essas células (Matter *et al.*, 2011).

As cepas foram mantidas em glicerol a -80° C. Para os experimentos, as bactérias foram semeadas em ágar Luria Bertani (LB), posteriormente inoculadas em 5 mL de caldo LB e crescidas até a fase estacionária (18 h a 37 °C). Em seguida, 200 µL

desse inóculo foram diluídos em 20 mL de caldo LB e incubados a 37° C sob agitação (150-180 ver.min⁻¹) até a fase logarítmica (DO₆₀₀ = ~0,500). O número de bactérias viáveis neste ponto foi determinado por diluições em série plaqueadas em ágar LB. Para a infecção, o inóculo foi centrifugado (4.000 g por 10 min a 4 °C) e as bactérias ressuspensas em meio de cultura DMEM.

4.3.2.3 Ensaio para a extração de RNA

As células CEC32 foram plaqueadas em garrafas de 150 cm² com DMEM e 10% de SFB e, quando confluentes (~9 x 10⁶ células), foram lavadas com PBS, acrescentado meio novo e infectadas com a cepa MT78 ou IMT2470 em uma multiplicidade de infecção (MI) de 200 UFC por célula.

Previamente, determinou-se a concentração de 10⁸ UFC/mL como a concentração bacteriana mínima para a extração de uma quantidade de RNA suficiente para a síntese de cDNA, conforme verificado a partir da PCR do gene constitutivo *tus*. A MI de 200 foi usada por fornecer a concentração bacteriana necessária à extração de RNA sem, no entanto, causar excesso de bactérias na superfície do fibroblasto. Após 3 h de infecção, o meio foi homogeneizado manualmente, coletado e as bactérias sedimentadas para extração do RNA. A escolha pelas bactérias extracelulares ao invés das internalizadas permite analisar o que a bactéria estaria sintetizando para entrar na célula, ou seja, verificar o que a presença da célula eucariótica estaria induzindo na bactéria. Para esta comparação os ensaios foram realizados na presença e na ausência de células. O período de incubação escolhido foi de 3 h por fornecer parâmetros de comparação com outros trabalhos de análise *in vivo* (Chouikha *et al.*, 2008).

Após a centrifugação (4.000 g por 10 min a 4 °C), o sedimento bacteriano foi ressuspendido em 1 mL de trizol (Invitrogen) em agitador vórtex, acrescentado 200 µL de clorofórmio, homogeneizado por 15 segundos, incubado por 3 minutos e centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4°C. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para outro tubo, onde foi adicionado 500 µL de isopropanol, homogeneizado, incubado por 10 min e centrifugado a 12.000 g por 10 min. O sedimento foi, então, ressuspendido em 1 mL de etanol 75%, centrifugado a 7.500 g por 5 minutos, e secado à temperatura ambiente. A amostra foi estocada a - 80°C, após ter sido ressuspendida em 40 µL de água tratada com DEPC.

4.3.2.4 Síntese de cDNA

A integridade do RNA extraído foi verificada em gel eletroforese (gel 1%, 80 V, 1 h 30 min.) e a pureza foi verificada em espectrofotômetro (A_{260}/A_{280}). Após a quantificação (NanoDrop ND1000, Technologies, Wilmington, DE), o RNA foi tratado com DNase (Promega, Madison, USA) para a retirada de resíduos de DNA, conforme especificações do fabricante. A seguir, o cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA, 1 µg de oligonucleotídeo iniciador aleatório (Promega, Madison, USA), tampão para M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) 5X (Promega, Madison, USA), dNTPs 10 mM (cBiot, Porto Alegre, Brasil), 25 U de inibidor de ribonuclease (Promega, Madison, USA) e 200 U de enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega, Madison, USA) em um volume final de 25 µL, de acordo com as instruções do fabricante da enzima.

4.3.2.5 Expressão do gene constitutivo *tus* por RT-PCR

Com o objetivo de verificar a qualidade do RNA tratado com DNase e do cDNA sintetizado, uma PCR do gene *tus* (constitutivo) era efetuada antes da RT-PCR multiplex de cada amostra. A qualidade era verificada pela ausência de amplificação do gene *tus* (sense CGATAACCTTTCGCAAGCAGCGTT e antisense GGCAAATGACGATGCACCCATTCA) (Lie *et al.*, 2011) nas amostras de RNA tratado com DNase e a amplificação do gene no cDNA. Os reagentes e as concentrações da RT-PCR utilizadas foram conforme descrito para a PCR em Ewers *et al.* (2007), sendo as condições do termociclador (Peltier Effect Cycling, MJ Research Inc) as seguintes: 3 min a 95°C; 30 ciclos de 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C, 10 segundos a 72°C, e por final 72°C por 5 minutos. A amplificação foi visualizada em gel de agarose (0,8% em TBE), migrado em 80 V por 1 h e corado com brometo de etídeo. Como controle positivo, usou-se o produto de uma PCR do gene amplificado a partir do genoma bacteriano, extraído pelo método de fervura; no controle negativo não foi adicionado ácido nucléico.

4.3.2.6 Expressão dos genes de virulência por RT-PCR multiplex

A expressão dos genes associados à virulência das cepas MT78 e IMT2470 foi analisada sob contato com os fibroblastos e comparada com o cultivo, nas mesmas condições, na ausência de fibroblastos, isto é, apenas em DMEM suplementado com

10% de SFB por 3 h. A RT-PCR foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores, reagentes e as concentrações descritas na PCR por Ewers *et al.* (2007), sendo as condições do termociclador (Peltier Effect Cycling, MJ Research Inc) as seguintes: 3 min a 94°C; 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 3 min a 68°C, e 72°C por 10 minutos. A amplificação foi visualizada por eletroforese em gel de agarose (0,8% em TBE) migrado em 80 V por 1 h e corado com brometo de etídeo. As reações de controle positivas e negativas foram feitas como descrito acima (item 2.5).

4.3.2.7 Oligonucleotídeos para RT-qPCR

A fim de avaliar quantitativamente a expressão dos genes *fimH*, *ompA*, *ibeA* e *gimB* das cepas MT78 e IMT2470 quando em contato com fibroblastos, realizou-se a RT-qPCR. Os oligonucleotídeos iniciadores para os genes foram desenhados no programa *Primer Express v 3.3* (Applied Biosystems, UK) a partir das sequências obtidas no Genbank, conforme mostrado na Tabela 1. O gene *tus* (Li *et al.*, 2011; oligonucleotídeos iniciadores sense CGATAACCTTTCGCAAGCAGCGTT e antisense GGCAAATGACGATGCACCCATTCA, *amplicon* de 138 pb) foi utilizado como controle endógeno. Testou-se também o gene constitutivo *frr* (oligonucleotídeos iniciadores sense GCGTAGAAGCGTTCAAACC e antisense CAAGATCGGACGCCATAATC; Chouikha *et al.*, 2008), no entanto, o mesmo apresentou amplificações inespecíficas nas condições da reação.

Tabela 1. Genes analisados na PCR quantitativa

Gene alvo	Número de acesso	Sequencia (5'-3')	Tamanho do amplicon
<i>fimH</i>	EG10315	sense: CCCTGGTTCAGTGCCAATTC antisense: AATCGAGTTGCCCGCATCT	100 pb
<i>ompA</i>	EG10669	sense: TAACCCGTATGTTGGCTTTGAA antisense: TTGAACGCCCTGAGCTTTGT	100 pb
<i>ibeA</i>	AY248744.1	sense: ATGACGGTGGGAACAAGAGAA antisense: CCCCTATTGAATCCGCATGA	100 pb
<i>gimB</i>	AJ810519.1	sense: AGCCGCCAGGAATCAG antisense: CGTGTCACCAATACCCGATACA	100 pb

A reação da PCR quantitativa foi realizada com 80 ng de cDNA, 7,5 µL de SYBR master mix (2x) (Applied Biosystems, Warrington, UK) e 200 nM de cada iniciador para um volume final de 15 µL. Cada amostra foi amplificada em duplicata e o equipamento utilizado foi o Step One Plus (Applied Biosystem). As condições da reação foram: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A eficiência da amplificação de cada par de iniciador foi

verificada inicialmente com 80 e 160 ng de RNA. A pureza do produto amplificado foi verificada na curva de *melting* e em gel de eletroforese (agarose 1,5%) corado com brometo de etídeo. Os dados foram coletados e analisados pelo Software *StepOne* v.2 (Applied Biosystems), transportados para o software LinReg, para o cálculo da eficiência da reação. A expressão foi calculada usando a equação 1 de Pfaffl, tendo como normalizador os Cts do gene constitutivo *tus*. O nível da expressão dos genes de interesse, quando em contato com a célula, foi obtido usando o método de quantificação relativa aplicado à expressão do mesmo gene quando a bactéria era incubada apenas no meio de cultura celular (Pfaffl, 2001).

4.3.2.8 *Análise Estatística*

A análise estatística foi executada com o programa PRISM, aplicando o teste de Tukey para a análise dos dados e considerando $P < 0,05$ para a significância estatística.

4.3.3 **Resultados**

A Tabela 2 mostra o perfil de expressão dos VAGs das cepas APEC MT78 (invasiva) e IMT2470 (não invasiva), verificado por RT-PCR, com o propósito de caracterizar os genes de virulência expressos pelas mesmas em meio com e sem célula eucariótica, e estabelecer diferenças entre elas.

Tabela 2. Expressão gênica das cepas MT78 e IMT2470 na presença e ausência de fibroblastos aviários

Gene(s)	Descrição do gene	MT78 em DMEM	MT78 em Célula	MT2470 em DMEM	IMT2470 em Célula
Adesinas					
<i>crl</i>	Curli fiber gene	+	+	+	+
<i>fimC</i>	Type 1 fimbriae (D-mannose specific adhesin)	-	-	+	+
<i>hrlA/hek</i>	Heat-resistant agglutinin	+	+	+	+
Invasinas					
<i>gimB</i>	Genetic island associated with newborn meningitis	-	-	-	-
<i>ibeA</i>	Invasion of brain endothelium	-	-	-	-
Aquisição de ferro					
<i>chuA</i>	Heme receptor gene (<i>E. coli</i> haem utilization)	+	+	+	+
<i>fyuA</i>	Ferric yersinia uptake (yersiniabactin receptor)	-	-	-	+
<i>ireA</i>	Iron-responsive element (putative catecholate siderophore receptor)	+	+	+	+
<i>iroN</i> ¹	Catecholate siderophore (salmochelina) receptor	-	-	+	-
<i>irp2</i>	Iron repressible protein (yersiniabactin synthesis)	-	-	-	-
<i>iucD</i> ¹	Aerobactin synthesis	+	+	+	-
<i>sitD</i> chr.	<i>Salmonella</i> iron transport system gene	-	-	-	-
<i>sitD</i> ep. ¹	<i>Salmonella</i> iron transport system gene	-	-	-	-
Protectinas/Resistência ao soro					
<i>iss</i> ¹	Increased serum survival	+	+	+	+
<i>neuC</i>	K1 capsular polysaccharide	+	+	+	+
<i>kpsMT</i> II	Group II capsule antigens – APEC01	+	+	+	+
<i>ompA</i>	Outer membrane protein	+	+	+	-
<i>traT</i> ¹	Transfer Protein	+	+	+	+
Outros					
<i>malX</i>	Pathogenicity-associated island marker CFT073	-	-	-	-

Na análise por RT-PCR foi detectada a expressão de genes para adesinas, sideróforos e protectinas, mas não para invasinas (*ibeA* e *gimB*) e para o marcador de IPA *malX*, nas cepas MT78 e IMT2470 (Tabela 2).

Em relação às adesinas, o curli foi expresso por ambas MT78 e IMT2470 (Tabela 2), principalmente na presença de células. Da mesma forma, foi expresso o gene responsável pela aglutinina resistente ao calor (*hra*). Já a fimbria tipo 1 (*fimC*) apresentou expressão visível apenas para a cepa IMT2470.

Dos oito genes relacionados aos sideróforos (*chuA*, *fyuA*, *ireA*, *iroN*, *irp2*, *iucD*, *sitD chr.*, *sitD ep.*) presentes nas cepas, pelo menos três encontravam-se sempre sendo expressos, tanto na presença como na ausência de fibroblastos para ambas as cepas, inclusive com *chuA* e *ireA* sendo expressos intensamente (semelhante ao gene constitutivo *tus*). A cepa IMT2470 ainda apresentou a expressão do *iroN* quando cultivada apenas em DMEM (com SFB) e *fyuA* quando cultivada com fibroblastos (Tabela 2).

Em relação aos genes associados às estruturas de resistência ao soro, o estudo mostrou a expressão de todos (*iss*, *neuC*, *kpsMT II*, *ompA* e *traT*), tanto na presença quanto na ausência de fibroblastos, com exceção do gene *ompA*, cuja expressão pela IMT2470 estava reprimida na presença de fibroblastos (Tabela 2). Os genes relacionados à síntese da cápsula (*neuC* e *kpsMT II*) apresentaram alta expressão, com bandas na intensidade do gene constitutivo *tus*.

Chouikha *et al.* (2008) observaram que a expressão do gene *ibeA in vivo* era 400 vezes menor do que a do gene constitutivo *frr*, mostrando tratar-se de um gene pouco expresso. Este fato pode explicar a não visualização da expressão deste gene e de outros como *gimB* por RT-PCR convencional, exigindo uma análise pela técnica mais sensível de RT-qPCR.

Desta forma, analisamos a expressão por RT-qPCR dos genes *fimH*, *ompA*, *ibeA* e *gimB*, genes responsáveis pela invasão de NMEC em células endoteliais cerebrais humanas (HBMEC) (Kim, 2008), afim de detectar diferenças na expressão que explicasse o fenótipo de invasão da cepa MT78.

Após 3 h de contato entre fibroblastos e as cepas bacterianas, a transcrição do gene *fimH* encontrava-se reprimida na cepa MT78, mas induzida na IMT2470. Já a expressão das invasinas *gimB* e *ibeA* estavam induzidas em MT78 e reprimidas em IMT2470, enquanto o gene *ompA* encontrava-se expresso em ambas as cepas (Figura 1).

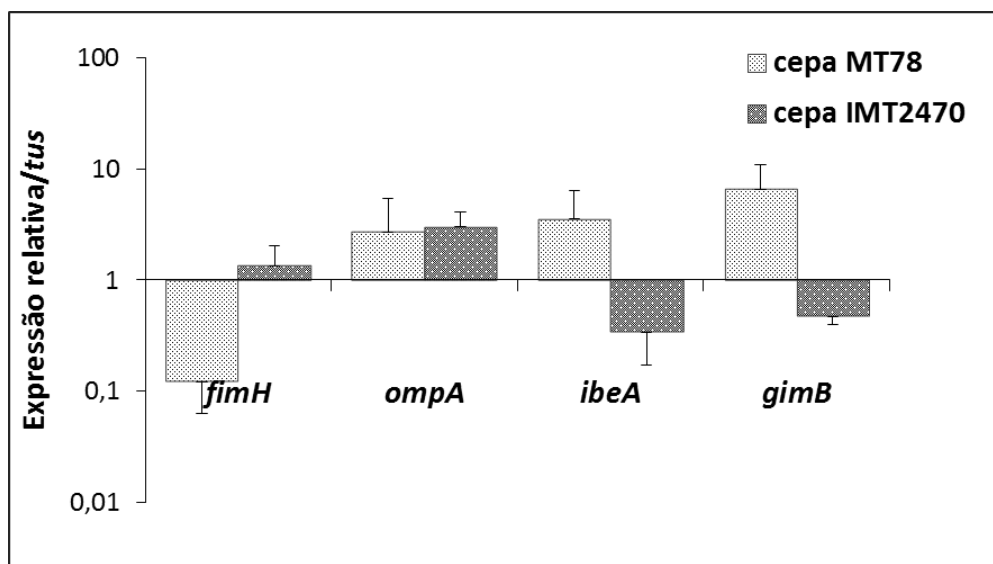


Figura 1. Expressão de genes nas cepas invasiva MT78 e não invasiva IMT2470 quando incubadas com fibroblastos aviários por 3 h. Medidas realizadas por RT-qPCR, sendo a expressão relativa calculada em função do crescimento da cepa no meio de cultura celular sem fibroblasto (eixo em log). Média de três experimentos. Os valores de *gimB* diferem estatisticamente para ambas as cepas ($P < 0.05$), os demais não.

4.3.4 Discussão

4.3.4.1 Análise da expressão para caracterização do patotipo APEC

A tentativa de caracterização do patotipo de APEC tem sido realizada largamente através da genotipagem de genes associados à virulência (VAGs). Acredita-se que (1) as adesinas e invasinas respondam pela colonização dos sítios extra-intestinais, como por exemplo, o epitélio respiratório, que (2) as proteínas de resistência ao soro sejam importantes para a bactéria resistir ao efeito bactericida do soro e evadir os sistemas fagocíticos de defesa do hospedeiro, e que (3) os sistemas sideróforos permitam a sobrevivência bacteriana nos líquidos do hospedeiro. A importância desses fatores de virulência é evidenciada pela presença de vários genes dedicados à mesma função. Por outro lado, o fato da combinação dos vários genes para uma mesma função na virulência poder variar muito de cepa para cepa dificulta a caracterização do patotipo de APEC. Assim, como a genotipagem dos VAGs não necessariamente distingue a virulência ou explica o fenótipo das cepas de APEC, a análise da expressão permite evidenciar tais diferenças.

O transcriptoma dos VAGs das APEC MT78 e IMT2470, obtido por RT-PCR, revelou a expressão dos três principais grupos de virulência: as adesinas (*crl*, *fimC* e

hrlA), as protectinas/estruturas de resistência ao soro (*iss*, *neuC*, *kpsMTII*, *ompA* e *traT*) e os sideróforos (*chuA*, *ireA*, *iroN* e *iucD*) (Tabela 2). Zhao *et al.* (2009) verificaram a expressão de sideróforos e estruturas de resistência em modelo *in vivo*, confirmando a importância destes dois grupos para a virulência de APEC. As adesinas, no entanto, não foram testadas pelos autores.

Em relação às adesinas, o curli tem sido associado ao aumento da aderência da *E. coli shiga-like* em células de linhagem do cólon (Rosser *et al.*, 2008) e, segundo Gophna *et al.* (2001), ele é responsável pela invasão bacteriana à diversas células eucarióticas. Já a aglutinina resistente ao calor (*hra*), por sua vez, é uma adesina amplamente encontrada em UPEC (Srinivasan *et al.*, 2003). Em nosso experimento, tanto o *crl* quanto a *hra* foram expressos pelas MT78 e IMT2470, na presença e ausência de células (Tabela 2), tal fato pode estar associado a capacidade de ambas as cepas em aderir aos fibroblastos (Matter *et al.*, 2011). Já em relação a fimbria tipo 1, observou-se a expressão do gene *fimC*, responsável pela codificação da chaperona da fímbria, apenas pela cepa IMT2470.

A presença de vários genes associados aos sideróforos nessas duas cepas, mas somente a expressão de alguns (*chuA* e *ireA* intensamente e *iucD* e o *iroN* fracamente) sugere uma grande plasticidade do patotipo, indicando que o mesmo possua muitos mecanismos alternativos ou compensatórios para a captação de ferro e que podem ser acionados nos diferentes estágios de infecção. Além disso, a inexistência ou a baixa prevalência de sistemas de aquisição de ferro na K12 (Matter *et al.*, 2011) e em outras cepas não patogênicas e a alta prevalência deles em cepas patogênicas (Ewers *et al.*, 2009; Matter *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2003), aliado ao fato de que a expressão de alguns destes genes está sempre presente nas situações analisadas neste e em outros estudos (Zhao *et al.*, 2009, Chouikha *et al.*, 2008), mostra que os sideróforos representam um fator de virulência essencial para APEC. Uma análise da expressão *in vivo* da BEN2908 (MT78 Nal^R) mostrou a expressão do *iutA* (receptor de membrana da aerobactina) nos sacos aéreos e pulmões da ave logo após 1 h da inoculação, sendo que após 3 h da inoculação os níveis de expressão estavam muito altos (22 a 125x) (Chouikha *et al.*, 2008).

Os genes associados às estruturas de resistência ao soro *iss*, *neuC*, *kpsMT II*, *ompA* e *traT* foram expressos pelas duas cepas tanto na ausência quanto na presença de células, com exceção do gene *ompA*, cuja expressão pela IMT2470 não foi detectada na presença de células. As proteínas da membrana externa e antígeno capsular K1 (polissacarídeo) estão associados à resistência ao soro de cepas de SEPEC (*Escherichia*

coli septicêmica). A cápsula tem sido citada como uma das mais importantes estruturas de resistência à fagocitose em SEPEC pela sua hidrofobicidade e carga elétrica negativa (Gyles, 2010).

4.3.4.2 Análise da expressão para caracterização do fenótipo invasivo da APEC

A cepa MT78 possui em seu genoma os genes para as invasinas IbeA e GimB e apresenta a capacidade de invadir fibroblastos aviários, enquanto a cepa IMT2470 possui, além dos genes *ibeA* e *gimB*, o gene para a invasina Tia, porém, não apresenta o fenótipo invasivo (Matter *et al.*, 2011). Tal fato poderia ser explicado pela diferença na expressão de tais genes, ou alternativamente, devido a existência de genes de invasão ainda desconhecidos em APEC.

Muitos fatores associados à virulência têm sido relacionados ao fenótipo de invasão da *E. coli*. Entre eles estão a OmpA, IbeA, GimB e FimH, os quais participam do processo de invasão de cepas NMEC em células BMEC (Kim, 2008, Germon *et al.*, 2005, Prasadaráo *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 2011; Bonacorsi *et al.*, 2002). A fimbria tipo I tem sido relacionada também ao processo de invasão de UPEC em células epiteliais de bexiga, o que explicaria os casos de reincidivas da doença (Thumbikat *et al.*, 2009).

Pela análise por RT-PCR, no entanto, não foi possível distinguir nenhuma diferença na expressão dos genes relacionados às adesinas, invasinas e ompA que pudesse explicar os fenótipos invasivo e não-invasivo da MT78 e IMT2470, respectivamente (Tabela 2). Devido a importância de OmpA, IbeA, GimB e FimH no processo de invasão da ExPEC NMEC, analisamos a expressão desses genes nas duas cepas APEC, na ausência e presença de fibroblastos, por RT-qPCR. Ao utilizarmos essa técnica mais sensível, observamos a indução da expressão dos genes *ibeA* e *gimB* após o contato com fibroblastos na cepa invasiva MT78, mas não na cepa não invasiva IMT2470. Esses resultados sugerem a participação dos genes *gimB* e *ibeA* no processo de invasão fibroblastos aviários por APEC, e explicam ao menos em parte o diferente fenótipo das duas cepas.

Assim como não detectamos a expressão de *fimC* por RT-PCR, também não detectamos a expressão da adesina *fimH* por RT-qPCR na MT78, ao contrário do observado na cepa não invasiva, cuja expressão da *fim* foi detectada pelas duas técnicas. A expressão da fimbria tipo 1 no processo de colonização da APEC à célula eucariótica tem sido extensamente comprovada (La Ragione *et al.*, 2000a; La Ragione *et al.*, 2000b), inclusive existem evidências da sua participação na invasão da cepa MT78 em

fibroblastos, visto tratamento das bactérias com D-manose (receptor para a fimbria tipo 1) diminuir 100 vezes o nível de invasão da bactéria (comunicação pessoal de Daniel Pavanelo). Acreditamos, porém, que esta interferência seja mais devido à importância da adesão no processo de invasão do que necessariamente a sua ação direta no processo de invasão, já que a cepa IMT2470 apresentou também a expressão da fimbria tipo 1 (verificada por RT-PCR e RT-qPCR) e capacidade de aderir (Matter *et al.*, 2011), porém não foi capaz de invadir os fibroblastos.

Uma explicação para a transcrição do gene *fimH*, que codifica a adesina da fimbria tipo 1, estar reprimida na cepa invasiva é o fato da maioria das bactérias encontrar-se em processo de invasão, não necessitando mais da síntese da adesina. Assim, a cepa invasiva estaria direcionando a sua energia à síntese de invasinas (por exemplo *ibeA* e *gimB*), visto estas estarem em níveis aumentados na cepa. Por esta razão, uma análise da expressão em diferentes períodos após a infecção mostraria evidências sobre a sua participação efetiva na adesão à célula eucariótica.

Existem evidências de que pode existir um regulador comum entre os diferentes genes de virulência. Cortes *et al.* (2008) verificaram uma relação de regulação da expressão entre o gene invasivo *ibeA* e a fimbria do tipo 1. Os autores observaram que a mutação no gene *ibeA* levava à diminuição na expressão das recombinases FimB e FimE, estando assim, a região promotora da fimbria tipo 1 na orientação *off* e com isso, expressando menos fimbria e, conseqüentemente, aderindo menos na célula HBMEC. Wang *et al.* (2011) também observaram a redução no nível de expressão dos genes *fimC* e *tsh* para o mutante \DeltaibeA .

Outro exemplo de relação entre a regulação gênica de genes de virulência refere-se a fimbria P e o sideróforo aerobactina, em UPEC. Foi verificado que a região reguladora da fimbria P sofre um aumento na expressão quando a fimbria entra em contato com a célula eucariótica e que uma mutação nesta região torna a cepa incapaz de sintetizar sideróforo aerobactina quando a cepa está em ambiente com baixas concentrações de ferro (Zhang e Normark, 1996). Outra relação de regulação entre os fatores de virulência, refere-se aos genes *ompA* e *fim*. Teng *et al.* (2006) verificaram por *microarray* que o mutante \DeltaompA apresentava uma diminuição significativa na expressão dos genes do cluster da *fim*. O mecanismo exato deste efeito ainda não se encontra elucidado.

Recentemente De Pace *et al.* (2010) verificaram a presença do sistema de secreção do tipo 6 (T6SS) em APEC isolada de septicemia. Tal estrutura pode

representar mais um fator de virulência nestas cepas e com possibilidade de estarem relacionados à invasão. Segundo os autores, mutações nos genes do T6SS *hcp* e *clpv* ocasionaram a redução da adesão (Δhcp e $\Delta clpv$) e invasão da APEC (Δhcp) em células HELA; redução da expressão da fimbria tipo 1 (Δhcp e $\Delta clpv$) e diminuição da patogenicidade verificada *in vivo* (Δhcp e $\Delta clpv$). A relação do SST6 com a expressão da fimbria tipo 1, porém, ainda permanece desconhecida, bem como a função desta na patogenicidade. Em relação ao curli nenhuma alteração foi verificada com as mutações.

4.3.5 Conclusões

Genes relacionados às adesinas, sideróforos e de resistência ao soro mostraram ser importantes no processo de crescimento das APEC MT78 e IMT2470, independente do fenótipo de invasão. Este fato, aliado à constante presença destes genes nos isolados de APEC, reforça a idéia de que estes três grupos sejam essenciais para o patotipo APEC. Por outro lado, o aumento da expressão dos genes relacionados às invasinas, *ibeA* e *gimB*, pela cepa invasiva MT78 sugere a participação desses genes na invasão dos fibroblastos aviários, assim como também acontece nas cepas causadoras de meningite do recém-nascido. Já a fimbria tipo 1 não mostrou ter participação direta no processo de invasão.

4.3.6 Referências

- 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, 2002.
- BRITO, B. G., GAZIRI, L. C. J., VIDOTTO, M. C., Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infection and Immunity*, 71 (7):4175-4177, 2003.
- CHANTELOUP, N. K., PORCHERON, G., DELALEU, B., GERMON, P., SCHOULER, C., MOULIN-SCHOULEUR, M., GILOT, P. The extra-intestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 invades avian and human epithelial cells and survives intracellularly. *Veterinary Microbiology*, 27; 147 (3-4): 435-439, 2011

- CHOUIKHA, I., BREE, A., MOULIN-SCHOULEUR, M., GILOT, P., GERMON, P. Differential expression of *iutA* in the early stages of infection by extra-intestinal pathogenic *E. coli*. *Microbes and Infection*, 10: 432-438, 2008.
- CORTES, M. A., GIBON, J., CHANTELOUP, N. K., MOUKIN-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.
- CRÉPIN, S., LAMARCHE, M. G., GARNEAU, P., SÉGUIN, J., PROULX, J., DOZOIS, C. M. & HAREL, J. Genome-wide transcriptional response of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) *pst* mutant. *BMC Genomics*, 9: 1-17, 2008
- DE PACE, F., NAKAZATO, G., PACHECO, A., DE, J. B., SPERANDIO, V., DA SILVEIRA, W. D. 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 (12): 4990-8, 2010
- DOZOIS, C. M., DAIGLE, F. & CURTISS, R. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *PNAS*, 100 (1): 247-252, 2003.
- DHO, M. & LAFONT, J. P. *Escherichia coli* Colonization of the Trachea in Poultry: Comparison of Virulent and Avirulent Strains in Gnotoxenic Chickens. *Avian Diseases*, 26 (4) : 787-797, 1982.
- 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., JANSSEN, T., KIESSLING, S., PHILIPP, H. C. & WIELER, L. H. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 49: 269-273, 2005.
- 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 potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (1): 184-192, 2009.
- 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.

- GOPHNA, U., BARLEV, M., SEIFFERS, R., OELSCHLAGER, T. A., HACKER, J. & RON, E. Z. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 69 (4): 2659–2665, 2001.
- GYLES, C. and FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli* in: GYLES, C., PRESCOTT, J. F., SONGER, J. G. and THOEN, C. O. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Wiley-Blackwell Ed, Fourth Edition, 267-308, 2010 Iowa, USA
- KIM, K. S. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier *Nature Reviews Microbiology*, 6: 625-634, 2008.
- LA RAGIONE, R. M., COOLEY, W. A., WOODWARD, M. J. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *Journal Med. Microbiol.*, 49: 327-338, 2000a.
- LA RAGIONE, R.M., SAYERS, A.R. & WOODWARD, M.J. The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old-chick model. *Epidemiology and Infection*, 124: 351-363, 2000b
- LA RAGIONE, R. M. and WOODWARD, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticemia. *Research in Veterinary Science*, 73: 27-35, 2002.
- LI, G., TIVENDALE, K. A., LIU, P., FENG, Y., WANNEMUEHLER, Y., CAI, W., MANGIAMELE, P., JOHNSON, T.J., CONSTANTINIDOU, C., PENN, C.W., NOLAN, L.K. Transcriptome analysis of avian pathogenic *Escherichia coli* O1 in chicken serum reveals adaptive responses to systemic infection. *Infect Immun*. 2011 Feb 28. [Epub ahead of print]
- MATTER, L. B., BARBIERI, N.L., NORDHOFF, M., EWERS, C. & HORN, F. Avian Pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken fibroblasts. *Vet Microbiol* 24;148 (1):51-9, 2011.
- PRASADARÃO, N. V., WASS, C. A., and KIM, K. S. Endothelial Cell GlcNAc1-4GlcNAc Epitopes for Outer Membrane Protein A Enhance Traversal of *Escherichia coli* across the Blood-Brain Barrier *Infection and Immunity*, 64 (1): 154–160, 1996.
- PFAFFI, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 (9): 2002-2007, 2001
- RAMÍREZ, R. M, ALMANZA, Y., GRACÍA, S., HEREDIA, N. Adherence and invasion of avian pathogenic *Escherichia coli* to avian tracheal epithelial cells. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 1019-1023, 2009.
- ROSSER, T., DRANSFIELD, T., ALLISON, L., HANSON, M., HOLDEN, N., EVANS, J., NAYLOR, S., LA RAGIONE, R., LOW, C., GALLY, D. L. Pathogenic potential of emergent sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:NM. *Infection and Immunity*, 76 (12): 5598-5607, 2008.

- SRINIVASAN, U., FOXMAN, B. & MARRS, C. F. Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in *Escherichia coli* as a putative virulence factor in urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 285-289, 2003.
- TENG, C. H., XIE, Y., SHIN, S., Di Cello, F., PAUL-SATYASEELA, M., CAI, M., KIM, K. S. Effects of *ompA* deletion on expression of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K1 strain RS218 and on the association of *E. coli* with human brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 74: 5609-5616, 2006.
- TIVENDALE, K. A., LOGUE, C. M., KARIYAWASAM, S., JORDAN, D., HUSSEIN, A., LI, G., WANNEMUEHLER, Y. and NOLAN, L. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infection and Immunity*, 78 (08): 3412-3419, 2010.
- THUMBIKAT, P., BERRY, R. E., ZHOU, G., BILLIPS, B. K., YAGGIE, R. E., ZAICHUK, T., SUN, T., SCHAEFFER, A. J., KLUMPP, D. J. Bacteria-induced uroplakin signaling mediates bladder response to infection. *PLOS Pathogens*, 5 (5): 1-17, 2009.
- WANG, S., NIU, C., SHI, Z., XIA, Y., YAQOUB, M., DAI, J., LU, C. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 79 (1): 279-287, 2011.
- ZHANG, J. P., & NORMARK, S. Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science*, 273: 1234-1236, 1996.
- 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.

5 DISCUSSÃO GERAL DA TESE

Neste trabalho, foram utilizados fibroblastos aviários CEC-32 e células endoteliais humanas EAhy926 para verificar o comportamento da APEC ao infectar células não fagocitárias *in vitro*. Embora existam trabalhos sobre a adesão da APEC em diversas células e explantes (La Ragione *et al.*, 2000a; 2000b; Silveira *et al.*, 2002; Ramirez *et al.*, 2009), este trabalho representou a primeira quantificação intracelular de várias cepas APEC em células não fagocitárias aviárias.

Os resultados em fibroblastos aviários sugerem a possibilidade da APEC usar o mecanismo de invasão para atravessar a barreira epitelial do trato respiratório da ave e chegar a via sistêmica. Esse mecanismo provavelmente envolve o rearranjo dos filamentos de actina, já que o uso da citocalasina D, um inibidor da polimerização da actina, inibiu a invasão da cepa MT78 nos fibroblastos. Cepas de APEC não invasivas certamente chegam ao sistema circulatório através de outras rotas.

Apesar de algumas ExPEC, como por exemplo a UPEC (Thumbikat *et al.*, 2009), usarem a citotoxicidade e a apoptose no processo de infecção da célula do epitélio urinário humano, as APEC não desencadearam este efeito em fibroblastos. Já em macrófago J774 (de camundongo), a cepa UEL17 (usada também neste trabalho) foi capaz de desencadear a apoptose e apresentar efeito citotóxico à célula (Bastiani *et al.*, 2005).

Em relação à adesão, todas as cepas mostraram capacidade de aderir aos fibroblastos aviários, o que deve ter importância no processo de colonização do tecido, visto ser a adesão importante nas primeiras etapas da colonização. Em se tratando dos processos de adesão e invasão, as adesinas e as invasinas são as estruturas respectivamente envolvidas. Existem trabalhos que mostram, no entanto, a participação das adesinas também no processo de invasão. Esse é o caso da fimbria tipo 1, a qual está envolvida também nos processos de invasão da NMEC no endotélio cerebral humano e da UPEC no epitélio urinário. No caso da NMEC, a participação da F1 é direta, polimerizando as fibras de actina e levando à mudança da morfologia celular para o englobamento da bactéria pela célula. Em nosso laboratório, foi observado que a invasão da cepa MT78 em fibroblastos (CEC32) foi reduzida 100 X quando as fimbrias tipo 1 eram bloqueadas com D-manose (Daniel Pavanelo, resultados não publicados),

mostrando a participação dessa adesina no processo de invasão. No entanto, acredita-se que na interação MT78-fibroblasto a sua participação seja indireta, através da influência no processo de adesão e não especificamente no processo de invasão, visto que no momento da invasão (3 h de contato) não ocorre mais a expressão da fímbria tipo 1 e sim das invasinas *ibeA* e *gimB*. Como a adesão é uma etapa que antecede a invasão, qualquer interferência nela tem como consequência a interferência também no processo de invasão. Curiosamente, Chanteloup et al. (2010) quando realizaram o ensaio de adesão e invasão com a cepa DM34 (BEN2908 *fim*⁻), verificaram uma redução no nível de invasão (25,5%) semelhante ao da adesão (31,8%) quando comparado com os ensaios realizados com a cepa não mutada BEN2908.

O fato dos genes para as invasinas *ibeA* e *gimB* estarem sendo expressos na cepa com fenótipo invasivo e não na cepa não invasiva sugere a participação dessas no processo de invasão. Já foi constatada a influência de *ibeA* na invasão da BEN2908 (MT78 ácido nalidíxico resistente) em BMEC e de NMEC em HBMEC (Germon *et al.*, 2005; Prasadaráo *et al.*, 1996). Em relação ao *gimB*, foi verificada a sua participação na invasão de NMEC em endotélio cerebral humano (Bonacorsi *et al.*, 2002).

Contudo, a interação MT78-CEC32 pode representar um adequado e útil modelo experimental para estudar o mecanismo molecular usado pela APEC para invadir células não fagocitárias aviárias. O estudo da expressão por RT-qPCR dos genes *fimH*, *ompA*, *ibeA* e *gimB* em APEC, no momento da interação com fibroblastos, confirmou ser este um modelo *in vitro* adequado para o estudo do mecanismo usado pela bactéria para invadir, já que evidenciou alterações na síntese da adesina fímbria tipo 1 e das invasinas *ibeA* e *gimB* no processo de invasão.

O fenótipo de invasão da MT78, porém, não foi evidenciado em células endoteliais umbilicais humanas (HUVEC), mostrando que as cepas podem apresentar um comportamento diferente em função do tipo celular e afinidade aos receptores específicos encontrados. Entretanto, a ausência do poder invasivo da APEC em HUVEC também é conhecida em NMEC, o que sugere similaridade de comportamento entre os dois patótipos. Outro resultado importante observado na interação APEC-HUVEC diz respeito à alta capacidade de adesão da APEC às células endoteliais humanas, indicando que as adesinas de APEC têm alta afinidade pelos receptores celulares do endotélio sistêmico humano [mostrando a afinidade das adesinas pelos receptores celulares do

endotélio sistêmico humano]. Tal fato pode favorecer a adesão bacteriana a tecidos que possuem receptores da mesma natureza, e levar à colonização das bactérias neste tecido.

O conhecimento dos mecanismos de patogenicidade, bem como das estruturas bacterianas envolvidas neste processo, possibilitará o desenho de drogas que bloqueiam tais substâncias, interferindo na via induzida pela bactéria, conhecimento que também poderá ser aplicado a outros tipos de interação bactéria-hospedeiro.

Visto o grande número de adesinas e sua comprovada ação na adesão, pode-se supor que exista um mecanismo compensatório entre elas para que a bactéria sobreviva e se multiplique em determinado sítio. O mesmo se pode pensar para as invasinas e demais fatores de virulência. Trabalhos mostram que mutações pontuais em qualquer um destes genes têm levado à redução do processo em questão mas nunca a abolição do mesmo (Germon *et al.*, 2005; Chanteloup *et al.*, 2010; Cortes *et al.*, 2008; Marc *et al.*, 1998).

A grande variedade de genes de virulência e a existência de diferentes fenótipos distribuídos entre os isolados APEC pode sugerir a existência de possíveis subpatotipos dentro do grupo, com diferentes mecanismos de patogenicidade, assim como ocorre com as cepas causadoras de doenças intestinais.

6 PERSPECTIVAS

1. Verificar a influência da fimbria tipo 1 (F1) em ensaio de adesão com células endoteliais (HUVEC – Eahy926) e de adesão e invasão com fibroblastos aviários (CEC-32) pelo tratamento da MT78 e A2363 com D-manose.

Questionamento: qual o grau de participação da fimbria tipo 1 na adesão da APEC às EAh926 e na adesão e invasão da MT78 em fibroblastos?

2. Realizar a técnica de imunofluorescência, com as cepas A2363 e MT78, para as adesinas de superfície F1, mat e curli quando infectando fibroblastos aviários e células endoteliais.

Questionamento: estariam as adesinas F1, mat e curli sendo expressas nos processos de adesão e invasão nas diferentes células?

3. Pesquisar a presença de *mat* por PCR, na cepa MT78, utilizando diferentes oligonucleotídeos.

Questionamento: teria uma alteração na sequência do gene *mat* que não permitiu sua identificação na MT78, visto as estruturas visualizadas por SEM serem semelhantes ao Mat?

4. Confirmar por mutação a influência de *gimB* na invasão da cepa MT78 em fibroblastos aviários.

Questionamento: seria a ilha de patogenicidade *gimB* responsável pela invasão da cepa MT78 em fibroblastos aviários?

5. Analisar a expressão por RT-qPCR dos genes *fimH*, *ibeA* e *gimB* em diferentes períodos do processo de infecção de fibroblastos CEC32.

Questionamento: teria uma ordem na expressão dos genes acima citados dependente da etapa de infecção?

6. Analisar por microscopia, de varredura e de transmissão, a adesão da MT78 e da A2363 em CEC-32.

Questionamento: a interação entre uma cepa invasiva e outra não invasiva em fibroblastos aviários teriam diferenças visíveis por microscopia?

7 REFERÊNCIAS

- ABE, C. M., F. A. SALVADOR, I. N. FALSETTI, M. A. M. VIEIRA, J. BLANCO, J. E. BLANCO, M. BLANCO, A. M. O. MACHADO, W. P. ELIAS, R. T. HERNANDES and T. A. T. GOMES.. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52:397-406, 2008.
- ABEF. Relatório Anual da Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de frango de 2009/2010. Disponível em www.abef.com.br acesso em: 25 de maio, 2011
- AVICULTURA INDUSTRIAL, (www.aviculturaindustrial.com.br). Acesso em 25 de maio, 2011.
- ANTÃO, E.M., WIELER, L. H. & EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*, 1 (22): 1-12, 2009.
- ARNÉ, P., MARC, D., BREE, A., SCHOULER, C. & DHO-MOULIN, M. Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of Avian Pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a fimH deletion. *Avian Diseases*, 44: 343-355, 2000.
- ARRECUBIETA, C., HAMMARTON, T. C., BARRETT, B., CHAREONSUDJAI, S., HODSON, N., RAINEY, D. & ROBERTS, I. S. The transport of group 2 capsular polysaccharides across the periplasmic space in *Escherichia coli*. roles for the KpsE and KpsD proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 4245-4250, 2001.
- BALSALOBRE C, MORSCHHAUSER J, JASS J, HACKER J, UHLIN B.E. Transcriptional analysis of the sfa determinant revealing mmRNA processing events in the biogenesis of S fimbriae in pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 185(2):620-629, 2003.
- BASTIANI, M., VIDOTTO, M.C. & F. HORN. An avian pathogenic *Escherichia coli* isolate induces caspase 3/7 activation in J774 macrophage. *FEMS Microbiol. Lett.* 253 : 133-140, 2005.
- BAORTO, D.M, GAO, Z., MALAVIYA, R., DUSTIN, M.L., VAN DER MERWE, A., LUBLIN, D.M & ABRAHAM, S.N. Survival of FimH-expressing *enterobacteria* in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature*. 389 (6651):636-9, 1997.
- BAUCHART, P., GERMON, P., BRÉE, A., OSWALD, E., HACKER, J. and DOBRINDT, U. Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli* – search for factors involved in host specificity or zoonotic potential. *Microbial Pathogenesis*. 49:105-115, 2010
- BERTRAND, NICOLAS, HOULE, SEBASTIEN, LEBIHAN, GUILLAUME, POIRIER, E´ DITH, DOZOIS, CHARLES M., and HAREL, JOSE´E. Increased

- pho regulon activation correlates with decreased virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infection and Immunity*, 78(12): 5324–5331, 2010
- BINNS, M. M., DAVIES, D. L. & HARDY, K. G. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature*, 279: 778-781, 1979.
- BLACKBURN, D., HUSBAND, A., SALDANHA, Z., NADA, R. A., KLENA, J., QADRI, F. and GIRON, J. A. Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (6): 1781–1784, 2009.
- BLANCO, J.E., BLANCO, M., MORA, A. and BLANCO, J. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2953-2957.
- 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, 2002.
- BOUGUÉNEC, CHANTAL LE. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 471-478, 2005.
- BRITO, B. G., L. C. J. GAZIRI, AND M. C. VIDOTTO. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infection and Immunity*. 71:4175-4177, 2003.
- CAZA, M.F.L., MILOT, S., & DOZOIS, C.M. Specific Roles of the *iroBCDEN* Genes in Virulence of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* O78 Strain and in Production of Salmochelin. *Infect and Immun*, 76 : 3539–3549, 2008.
- CAZA, M., LEPINE, F. and DOZOIS, C.M. Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* ,(2011) _ doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07570.x
- CHANTELOUP, N. K., PORCHERON, G., DELALEU, B., GERMON, P., SCHOULER, C., MOULIN-SCHOULEUR, M., GILOT, P. The extra-intestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 invades avian and human epithelial cells and survives intracellularly. *Veterinary Microbiology*, 147 (4): 435-439, 2011.
- CORTES, M. A., GIBON, J., CHANTELOUP, N. K., MOUKIN-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.

- CRÉPIN, S., LAMARCHE, M. G., GARNEAU, P., SÉGUIN, J., PROULX, J., DOZOIS, C. M. & HAREL, J. Genome-wide transcriptional response of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) *pst* mutant. *BMC Genomics*, 9: 1-17, 2008
- CROXEN, M. A. and FINLAY B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature*, 8: 20-38, 2010.
- DENECKER, G.; DECLERCQ, W.; GEUIJEN, C.A.W.; BOLAND, A.; BENABDILLAH, R.; VAN GURP, M.; SORY, M-P.; VANDENABEELE, P. AND CORNELIS, G.R. *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signalling cascade upstream of Bid. *Journal of Biology Chemistry*, 276, 19706-19714, 2001.
- DA SILVEIRA, W.D., FERREIRA, A., BROCCHI M., HOLLANDA L.M., CASTRO A.F.P., YAMADA A.T. & LANCELLOTTI M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 85:47-53, 2002.
- DE PACE, F., NAKAZATO, G., PACHECO, A., DE, J. B., SPERANDIO, V., DA SILVEIRA, W. D. The type VI secretion system plays a role in type 1 fimbria expression and pathogenesis of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection Immunity*, 78 (12):4990-8, 2010
- DE RYCKE, J., MILON, A. & OSWALD, E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Veterinary Research*, 2 (3): 221-33, 1999.
- DHO-MOULIN, M. & FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, 30: 299-316, 1999.
- DONNENBERG, M. S. & KAPER, J. B. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.* 59, 4310–4317, 1991.
- DOZOIS, C.M., CHANTELOUP, N., DHO-MOULIN, M., BREE, A., DESAUTELS, C. & FAIRBROTHER, J.M. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 38: 231-239, 1994.
- DOZOIS, C.M.; POURBAKHS, S.A. and FAIRBROTHER, J.M., Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Veterinary Microbiol.* 45, 297-309, 1995.
- DOZOIS, C. M., DHO-MOULIN, M., BRÉE, A., FAIRBROTHER, J. M., DESAUTELS, C. & CURTISS, 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 (7):4145-4154, 2000.
- 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.

- ETO, D. S., JONES, T. A., SUNDSBAK, J. L., and MULVEY, M.A. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *PLOS Pathog.* 3(7), 2007
- EWERS, C., JANSSEN, T., KIESSLING, S., PHILIPP, H. C. & WIELER, L. H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology*, 104: 91-101, 2004.
- EWERS, C., LI, G., WILKING, H. ET AL. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related they are? *International Journal of Medical Microbiology*, 297: 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 potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (1): 184-192, 2009.
- FERREIRA, A. J. e KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI, A., MACARI, M., **Doenças das Aves**. FACTA – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, SP, 2000, 197-207.
- FINLAY, B. B. & FALKOW, S., Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (2): 136-169, 1997.
- FLECKENSTEIN, J. M., KOPECKO, D. J., WARREN, R. L. & ELSINGHORST, E. A. Molecular characterization of the tia invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 64: 2256-2265, 1996.
- GALLY, D.L, BOGAN, J.A., EISENSTEIN, B.I., BLOMFIELD, I.C. Invironmental regulation of the *fim* switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *J Bacteriol*, 175(19):6186-6193, 1993
- 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.
- GOPHNA, U., BARLEV, M., SEIJFFERS, R., OELSCHLAGER, T. A., HACKER, J. and RON, E. Z. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 69 (4): 2659–2665, 2001.
- GYLES, C. and FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli* in: GYLES, C., PRESCOTT, J. F., SONGER, J. G. and THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Wiley-Blackwell Ed, Fourth Edition, 267-308, 2010 Iowa, USA.
- GUYER, D. M., HENDERSON, I., R., NATARO, J. P. & MOBLEY, H. L. T. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 38 (1): 53-66, 2000.

- HACKER, J., KESTLER, H., HOSCHUTZKY, H., JANN, K. LOTTSPEICH, F. & KORHONEN, T. K. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. *Infection and Immunity*, 61: 544-550, 1993.
- HEIMER, S. R., RASKO, D. A., LOCKATELL, C. V., JOHNSON, D. E. & MPBLEY, H. L. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 72: 593-597, 2004.
- HENDERSON, I., NAVARRO-GARCIA, F., DESVAUX, M., FERNANDEZ, R. C., e ALA'ALDEEN, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (4): 692-744, 2004
- HERREN, C. D., MITRA, A., PALANIYANDI, S. K., COLEMAN, A., ELANKUMARAN, S. & MUKHOPADHYAY, S. The BarA-UvrY Two-Component System Regulates Virulence in Avian Pathogenic *Escherichia coli* O78:K80:H9. *Infect Immun* 74: 4900-4909, 2006.
- HILBI, H., MOSS, J.E., HERSH, D., CHEN, Y., ARONDEL, J., BANERJEE, S., FLAVELLI, R.A., YUAN, J., SANSONETTI, P.J., ZYCHLINSKY, A., Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *Journal of Biol. Chem.* 273, 32895-32900, 1998.
- HINDE, P., DEIGHAN, P. and DORMAN, C. Characterization of the detachable Rho-dependent transcription terminator of the *fimE* gene in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 187 (24): 8256-8266, 2005.
- HUANG, S-H.; STINS, M. F. and KIM, K. S. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes and Infection*, 2, 1237-1244, 2000.
- HUNG, C-S., BOUCKAERT, J., HUNG, D., PINKNER, J., WIDBERG, C., DEFUSCO, A., C. AUGUSTE, G., STROUSE, R., LANGERMANN, S., WAKSMAN, G. and HULTGREN, S. J. Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Molecular Microbiology*, 44(4), 903-915, 2002.
- JANßEN, T., SCHWARZ, C., PREIKSCHAT, P., VOSS, M., PHILIPP, H. C. and WIELER, L. H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal of Medical Microbiology*, 291: 371-378, 2001.
- JESENBERGER, V., PROCYK, K.J., YUAN, J., REIPERT, S., BACCARINI, M., Salmonella-induced caspase-2 activation in macrophages: A novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* 192, 1035-1046, 2000.
- 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.

- JOHNSON, T.L, S. KARIYAWASAM, Y. WANNEMUEHLER, P. MANGIAMELE, S.J. JOHNSON, C. DOETKOTT, J.A. SKYBERG, A.M. LYNNE, J.R. JOHNSON & L.K. NOLAN. Genome Sequence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain O1:K1:H7 Shares Strong Similarities with Human ExPEC Genomes. *J. Bacteriol.* 189:3228-3236, 2007.
- JOHNSON, T. J., WANNEMUEHLER, Y., DOETKOTT, C., JOHNSON, S. J., ROSENBERGER, S. C. & NOLAN, L. K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (12): 3987–3996, 2008.
- JOHNSON, J. R. & RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295: 383-404 2005.
- JOHNSON , T. J., SIEK, K. E., JOHNSON, S. J. & NOLAN, L. K. DNA sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic *Escherichia coli* transmissible R plasmid. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 49: 4681-4688, 2005.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. *Pathogenic E. coli*. *Nature Reviews in Microbiology*, 2: 123-140, 2004.
- KARIYAWASAM, S., T. J. JOHNSON, C. DEBROY, AND L. K. NOLAN.. Occurrence of pathogenicity island I (APEC-O1) genes among *Escherichia coli* implicated in avian colibacillosis. *Avian Diseases*, 50:405-410, 2006.
- KEHL-FIE, T., GEME III, J. W. ST. Identification and characterization of an RTX toxin in the emerging pathogen *Kingella kingae*. *J. Bacteriol.* 189, 430-436, 2007.
- KIM, K. S., Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nature Rev. Neuroscience*, 4, 376-385, 2003.
- KIM, K. S. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier *Nature Reviews Microbiology*, 6: 625-634, 2008.
- KHAN, N.A, KIM, Y., SHIN, S. and KIM, K.S. FimH-mediated *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol.* 9(1):169-78, 2007.
- KLINE, K.A., FÄLKER, S., DAHLBERG, S., NORMARK, S. and NORMARK, B.H. Bacterial adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe*, 5(18): 580-592.
- KORHONEN TK, VAISANEN V, SAXEN H, HULTBERG H, SVENSON SB: P-antigen-recognizing fimbriae from human uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun*, 37(1):286-291,1982.

- LANGILLE, M. G., HSIAO, W.W.L., and BRINKMAN, F. Detecting genomic islands using bioinformatics approaches. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 373- 382, 2010.
- LA RAGIONE, R. M., COOLEY, W. A., and WOODWARD, M. J. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *Journal Med. Microbiol.*, 49: 327-338, 2000a.
- LA RAGIONE, R.M., SAYERS, A.R. and WOODWARD, M.J. The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old-chick model. *Epidemiology and Infection*, 124: 351-363, 2000b.
- LA RAGIONE, R. M. and WOODWARD, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticemia. *Research in Veterinary Science*, 73: 27-35, 2002.
- LI, G., LATURNUS, C., EWERS, C. and WIELER, L. H. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature- tagged mutagenesis. *Infect Immun*, 73: 2818-2827, 2005.
- LINDBERG, S.; XIA, Y., SONDÉN, B., GÖRANSSON, M., HACKER, J. and UHLIN, B. E. Regulatory Interactions among Adhesin Gene Systems of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 76 (2): 771-780, 2008.
- MAGALHÃES, J. G., TATTOLI, I. and GIRARDIN, S. The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Sem. Immunol.* 19, 106-115, 2007
- MARC, D.; ARNÉ, P.; BRÉE, A. and DHO-MOULIN, M. Colonization ability and pathogenic properties of a *fim⁻* mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.*, 149: 473-485, 1998.
- MARTINEZ, J. J. and HULTGREN, S. J. Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. 4(1): 19-28, 2002.
- MARTINEZ-MEDINA, M., MORA, A., BLANCO, M., LO´PEZ, C., ALONSO, M. P., BONACORSI, S., NICOLAS-CHANOINE, M-H., DARFEUILLE- MICHAUD, A.,GARCIA-GIL, J. and BLANCO, J. Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains, *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (12): 3968–3979, 2009.
- MATTER, L. B., BARBIERI, N.L., NORDHOFF, M., EWERS, C. and HORN, F. Avian Pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken fibroblasts. *Vet. Microbiol.* 148 (1): 51-9, 2011.
- MELLATA, M., DHO-MOULIN, M., DOZOIS, C. M., CURTIS III, R., LEHOUX, B. and FAIRBROTHER, J. M. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence

- factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infection and Immunity* 71: 494-503, 2003.
- MOULIN-SCHOULEUR, M., C. SCHOULER, P. TAILLIEZ, M.-R. KAO, A. BRÉE, P. GERMON, E. OSWALD, J. MAINIL, M. BLANCO & J. BLANCO. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J. Clin. Microbiol.* 44:3484-3492, 2006.
- NAGAI, S., YAGIHASHI, T. & ISHIHAMA, A. An avian pathogenic *Escherichia coli* strain produces a hemolysin, the expression of which is dependent on cyclic AMP receptor protein gene function. *Veterinary Microbiology*, 60: 227-238, 1998.
- 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.
- NOLAN, L.K., WOOLEY, R.E., BROWN, J., SPEARS, K.R., DICKERSON, H.W. and DEKICH, M. Comparison of a complement resistance test, a chicken embryo lethality test, and the chicken lethality test for determining virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 36, 395-397, 1992.
- OLSEN, A., ARNQVIST, A., HAMMAR, M. and NORMARK, S. Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. *Infect. Agents Dis.* 2:272–274, 1993a.
- OLSEN, A., ARNQVIST, A., HAMMAR, M. and NORMARK, S. The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 7:523–536, 1993b.
- OLSEN, A, WICK, M. J., MORGELIN, M. and BJORCK, L. Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect. Immun.* 66: 944–994, 1998.
- 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 (9): 5087-5096, 2003.
- PEIGNE, C., BIDET, P., MAHJOUR-MESSAI, F., PLAINVERT, C., BARBE, V., ME'DIGUE, C., FRAPY, E., NASSIF, X., DENAMUR, E., BINGEN, E. AND BONACORSI, S. The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *e. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. *Infection and Immunity*, 77 (6): 2272–2284, 2009.
- PIZARRO-CERDÁ, J. and COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell.* 124(4), 715-727, 2006.
- POURBAKHS, S. A. ; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A. ; DESAUTELS, C. ; MARTINEAU-DOIZE and 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, 1997a
- POURBAKHS, S.A., BOULIANNE, M., MARTINEAU-DOIZÉ, B., and FAIRBROTHER, J.M., Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Veterinary Microbiology*, 58: 195-213, 1997b.
- POURBAKHS, S.A.; BOULIANNE, M.; MARTINEAU-DOIZÉ, B.; DOZOIS, C.M., DESAUTELS, C. and FAIRBROTHER, J.M. Dynamics of *Escherichia coli* infections in experimentally inoculated chickens. *Avian Diseases*, 41: 221-33, 1997c
- PROVENCE, D. L. & CURTIS, R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity*, 62 (4): 1369-1380, 1994.
- RAMIREZ, R.M., ALMANZA, Y., GARCIA, S. & HEREDIA, N. Adherence and invasion of avian pathogenic *Escherichia coli* to avian tracheal epithelial cells. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1019–1023, 2009.
- RENDON, M. A., SALDAÑA, Z., ERDEM, A. L., MONTEIRO-NETO, V., VAZQUEZ, A., KAPER, J., PUENTE, J. L. and GIRON, J. A. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *PNAS*, 104 (25) 2007.
- ROBERTS, P. H., DAVIS, K. C., GARSTKA, W. R., BHUNIA, A. K., Lactate dehydrogenase release assay from vero cells to distinguish verotoxin producing *Escherichia coli* from non-verotoxin producing strains. *J. Microbiol. Method.* 43, 171-181. 2001.
- RODRIGUES-SIEK, K. E., GIDDINGS, C. W., DOETKOT, C., JOHNSON, T. J., FAKHR, M. K. and NOLAN, L. K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, 151: 2097-2110, 2005a.
- RODRIGUES-SIEK, K. E., GIDDINGS, C. W., DOETKOT, C., JOHNSON, T. J., & NOLAN, L. K. Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res.* 36: 241–256, 2005b.
- RON, E.Z. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 9 (1): 28-32, 2006.
- 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 (10): 6209–6216, 2001.
- SABRI, M., CAZA, M., PROULX, J., LYMBEROPOULOS, M. H., BRÉE, A., MOULIN-SCHOULEUR, M., CURTISS 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.
- SABRI, M., LE VEILLE, S. & DOZOIS, C. M. A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology*, 152: 745-758, 2006.
- SALVADORI, M. R., YANO, T., CARVALHO, H. F., PARREIRA, V. R., GYLES, C.L. Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 45, 43-51, 2001.
- SAUER, F. G., MULVEY, M. A., SCHILLING, J. D., MARTINEZ, J. J. & HULTGREN, S. J. Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 65-72, 2000.
- SCHWAN, W.R, LEE, J.L., LENARD, F.A., MATTHEWS, B.T., BECK, M.T. Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 70(3):1391-1402,2002.
- SCHUBERT, S., PICARD, B., GOURIOU, S., HEESEMANN, J. & DENAMUR, E. Yersinia high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extra-intestinal infections. *Infection and Immunity*, 70: 5335-5337, 2002.
- SKYBERG, J. A., JOHNSON, T. J., JOHNSON, J. R., CLABOTS, C., LOGUE, C. M. & NOLAN, L. K. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infection and Immunity*, 74 (11): 6287–6292, 2006.
- SMITH, S. G. J., MAHON, V., LAMBERT, M. A. & FAGAN, R. P. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiological Letters*, 273: 1-11, 2007.
- DA SILVEIRA, W.D., FERREIRA, A., BROCCHI M., HOLLANDA L.M., CASTRO A.F.P., YAMADA A.T. and LANCELLOTTI M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 85:47-53, 2002.
- SORSA, L. J., DUFKE, S., HEESEMANN, J. and 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.
- SRINIVASAN, U., FOXMAN, B. and MARRS, C. F. Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in *Escherichia coli* as a putative virulence factor in urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 285-289, 2003.
- STORDEUR, P., BRÉE, A., MAINIL, J. and MOULIN-SCHOULEUR, M. Pathogenicity of *pap*-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicemic lesions. *Microbes and Infection*, 6: 637–645, 2004.

- STATHOPOULOS, C., PROVENCE, D. L. and CURTISS, R. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infection and Immunity*, 67 (2): 772-781, 1999.
- TEWARI R, IKEDA T, MALAVIYA R, MACGREGOR JI, LITTLE JR, HULTGREN S.J., ABRAHAM S.N. The PapG tip adhesin of P fimbriae protects *Escherichia coli* from neutrophil bactericidal activity. *Infect Immun*, 62(12):5296-5304,1994.
- TIVENDALE, K. A., LOGUE, C. M., KARIYAWASAM, S., JORDAN, D., HUSSEIN, A., LI, G., WANNEMUEHLER, Y. and NOLAN, L. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infection and Immunity*, 78 (08): 3412-3419, 2010.
- TIVENDALE, K. A., ALLEN, J. L., GINNS, C. A., CRABB, B. S. & BROWNING, G. F. Association of *iss* and *iucD*, but not *tsh*, with plasmid mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 72 (11): 6554-6560, 2004.
- THUMBIKAT, P., BERRY, R. E., ZHOU, G., BILLIPS, B. K., YAGGIE, R. E., ZAICHUK, T., SUN, T., SCHAEFFER, A. J., KLUMPP, D. J. Bacteria-induced uroplakin signaling mediates bladder response to infection. *PLOS Pathogens*, 5 (5): 1-17, 2009.
- UBA. Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura 2009/2010. Disponível em: www.uba.org.br. Acesso em: 23 maio de 2011.
- VAZQUEZ-TORRES, A., FANG, F.C. Cellular routes of invasion by enteropathogens. *Curr. Op. Microbiol.* 3, 54–59, 2000.
- VIDOTTO, M. C., MÜLLER, E. E., DE FREITAS, J. C., ALFIERI, A. A., GUIMARÃES, I. G. & SANTOS, D. S. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 34: 531-538, 1990.
- VIDOTTO, M. C., NAVARRO, H. R. and GAZIRI, L. C. J. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 59: 79-87, 1997.
- ZHAO L., GAO, S., HUAN, H., XU, X., ZHU, X., YANG, W., GAO, Q. and 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.

8 ANEXOS

8.1 Anexo A: Oligonucleotídeos usados para a detecção de genes associados à virulência em cepas APEC.

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados para a detecção de genes associados à virulência em cepas APEC.

Gene(s) ou operon	Descrição	Sequencia do oligonucleotídeo iniciador (5'-3'; senso/antisenso)	Tamanho do amplicon
Multiplex I			
<i>sfa/focCD</i>	S fimbriae (sialic acid-specific) and F1C fimbriae	GTCCTGACTCATCTGAAACTGCA CGGAGAACTGGGTGCATCTTA	1222 pb
<i>malX</i>	Pathogenicity-associated island marker	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	921 pb
<i>neuC</i>	K1 capsular polysaccharide	GGTGGTACATTCCGGGATGTC AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	675 pb
<i>iha</i>	Iron-regulated-gene-homologue adhesin	TAGTGC GTTGGGTTATCGCTC AAGCCAGAGTGGTTATTCGC	608 pb
<i>hrlA</i>	Heat-resistant agglutinin	TCACTTGCAGACCAGCGTTTC GTA ACTCACACTGCTGTCACCT	540 pb
<i>fimC</i>	Type 1 fimbriae (D-mannose specific adhesin)	GGGTAGAAAATGCCGATGGTG CGTCATTTTGGGGGTAAGTGC	496 pb
<i>pic</i>	Serin protease autotransporter	ACTGGATCTTAAGGCTCAGG TGGAATATCAGGGTGCCACT	410 pb
<i>kpsMT II</i>	Group II capsule antigens	GCGCATTTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	269 pb
Multiplex II			
<i>sitD</i> ep.	<i>Salmonella</i> iron transport system gene	CTATCGAGCAGGTGAGGA TTGAGAACGACAGCGACTTC	1032 pb
<i>ompA</i>	Outer membrane protein	AGCTATCGCGATTGCAGTG GGTGTGCCAGTAACCGG	918 pb
<i>iroN</i> ¹	Catecholate siderophore (salmochelin) receptor	ATCCTCTGGTCGCTAACTG CTGCACTGGAAGA ACTGTTCT	846 pb
<i>gimB</i>	Genetic island associated with newborn meningitis	TCCAGATTGAGCATATCCC CCTGTAACATGTTGGCTTCA	736 pb
<i>sitD</i> chr.	<i>Salmonella</i> iron transport system gene	ACTCCATACACAGGATCTG CTGTCTGTGTCCGGAATGA	553 pb
<i>traT</i>	Transfer Protein	GTGGTGCGATGAGCACAG TAGTTCACATCTTCCACCATCG	429 pb
<i>ibeA</i>	Invasion of brain endothelium	TGGAACCCGCTCGTAATATAC CTGCCTGTTCAAGCATTGCA	341 pb
<i>chuA</i>	Heme receptor gene (<i>E. coli</i> haem utilization)	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	278 pb

Multiplex III			
<i>vat</i>	Vacuolating autotransporter toxin	TCCTGGGACATAATGGTCAG GTGTCAGAACGGAATTGTC	980 pb
<i>tsh</i>	Temperature sensitive hemagglutinin	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC CTTCCGATGTTCTGAACGT	823 pb
<i>iucD</i>	Aerobactin synthesis	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC CCTGATCCAGATGATGCTC	710 pb
<i>cvi/cva</i>	Structural genes of colicin V operon	TCCAAGCGGACCCCTTATAG CGCAGCATAGTTCATGCT	597 pb
<i>papC</i>	Pilus associated with pyelonephritis	TGATATCACGCAGTCAGTAGC CCGGCCATATTCACATAAC	500 pb
<i>irp2</i>	Iron repressible protein (yersiniabactin synthesis)	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTGCGGCAGCGTTTCTTCT	286 pb
<i>iss</i>	Increased serum survival	ATCACATAGGATTCTGCCG CAGCGGAGTATAGATGCCA	309 pb
<i>astA</i>	EAST1 (heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative <i>E. coli</i>)	TGCCATCAACACAGTATATCC TCAGGTCGCGAGTGACGGC	110 pb
Multiplex IV			
<i>mat</i>	Meningitis associated and temperature regulated fimbriae	TATACGCTGGACTGAGTCGTG CAGGTAGCGTCGAACTGTA	900 pb
<i>fyuA</i>	Ferric yersinia uptake (yersiniabactin receptor)	GCGACGGGAAGCGATGACTTA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	774 pb
<i>tia</i>	Toxigenic invasion locus in ETEC strains	AGCGCTTCCGTCAGGACTT ACCAGCATCCAGATAGCGAT	512 pb
<i>ireA</i>	Iron-responsive element (putative catecholate siderophore receptor)	ATTGCCGTGATGTGTTCTGC CACGGATCACTTCAATGCGT	384 pb
<i>crlA</i>	Curli fiber gene	TTTCGATTGTCTGGCTGTATG CTTCAGATTCAGCGTCGTC	270 pb
Multiplex V			
<i>afa/drab</i>	Afimbrial/ Dr antigen-specific adhesin	TAAGGAAGTGAAGGAGCGTG CCAGTAACTGTCCGTGACA	809 pb
<i>sat</i>	Secreted autotransporter toxin	TGCTGGCTCTGGAGGAAC TTGAACATTCAGAGTACCGGG	667 pb
<i>cnf 1/2</i>	Cytotoxic necrotizing factor	TCGTTATAAAATCAAACAGTG CTTTACAATATTGACATGCTG	446 pb
<i>hlyA</i>	Hemolysin A	GTCCATTGCCGATAAGTTT AAGTAATTTTTGCCGTGTTTT	350 pb

8.2 Anexo B: Gráfico do ensaio de invasão com citocalasina

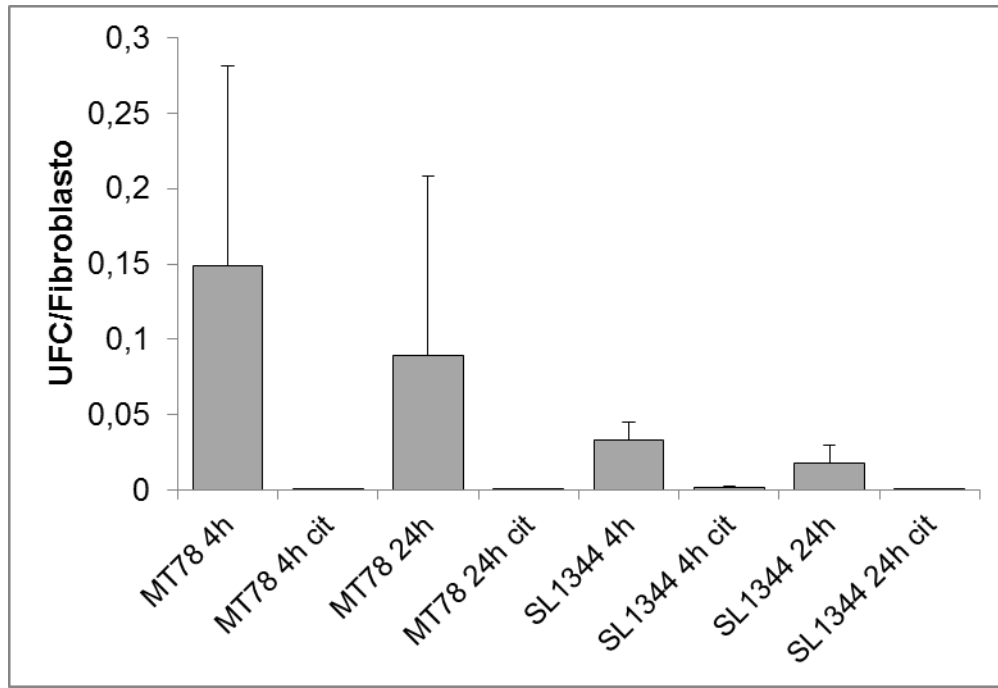


Figura 1. Ensaio de invasão com fibroblastos aviários com e sem citocalasina. Metodologia descrita no artigo 1.

8.3 Anexo C: Gráfico do ensaio de invasão com fibroblastos e células endoteliais EAhy926

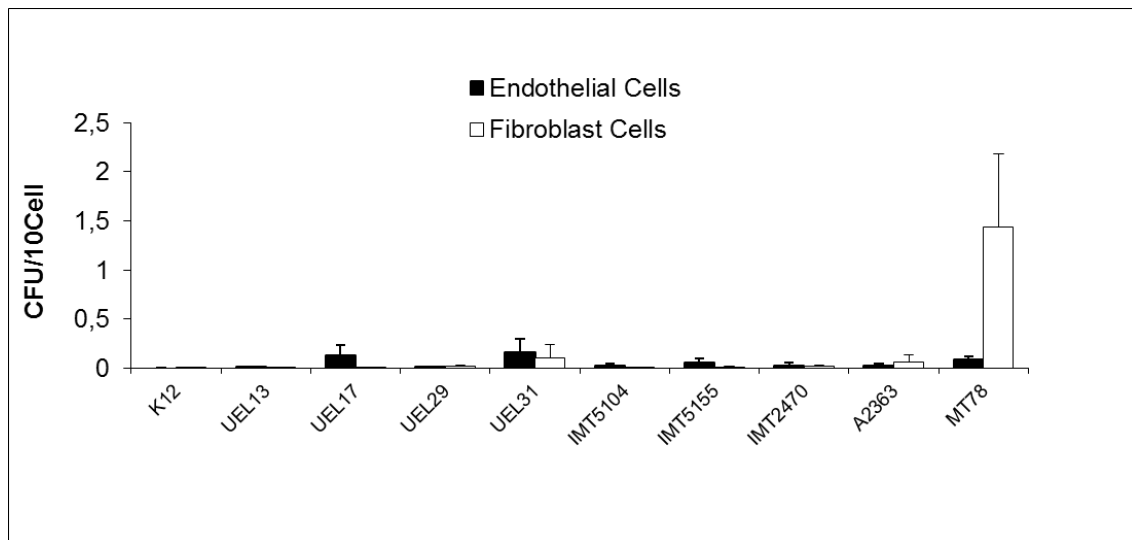


Figure 2. Gentamicin-resistance assay for APEC in EAhy926 endothelial cells (black bars) and CEC-32 fibroblast (white bars) after 4 p.i. Data represent the average of at least 3 experiments. Values differ statistically only for MT78 strain.

8.4 Anexo D: Gráfico do percentual de invasão em fibroblastos

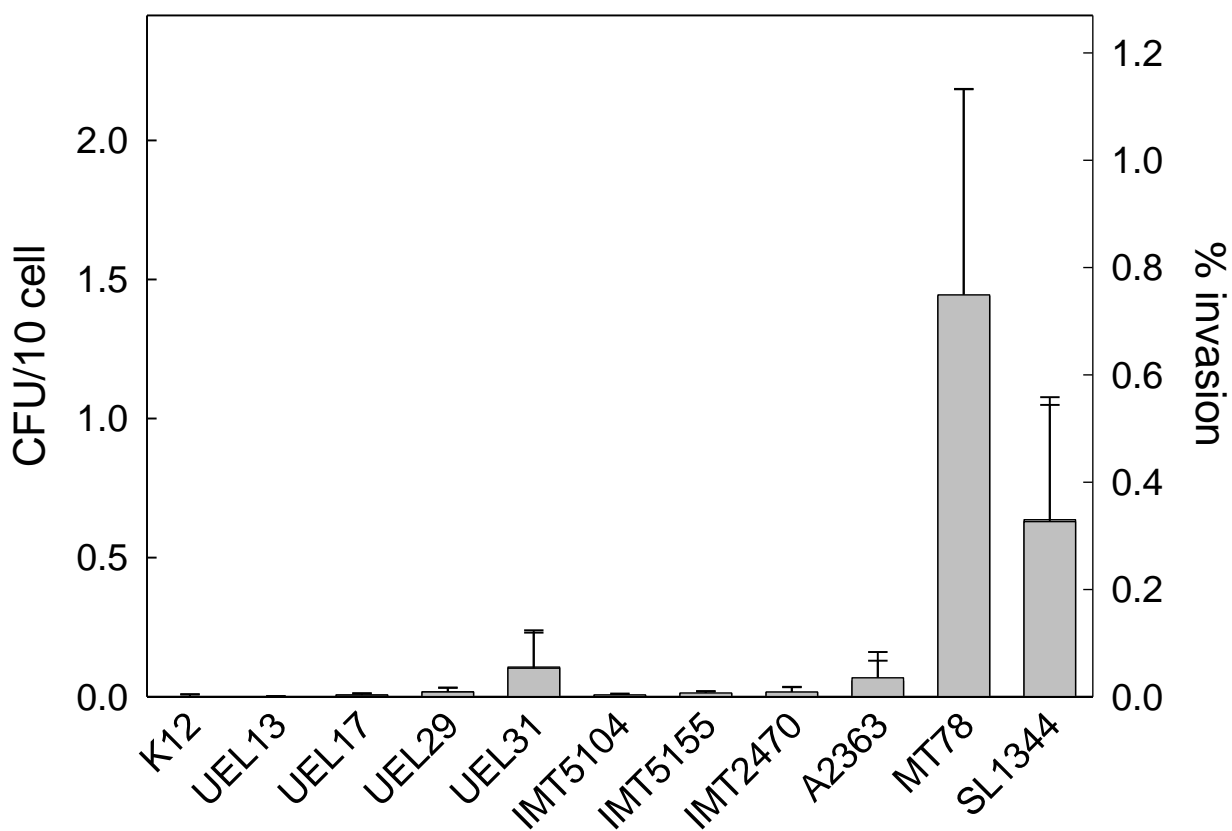


Figure 3. Percentual de invasão das bactérias em fibroblastos aviários mostrado no eixo Y à direita. Cálculo usado: $100 \times (\text{número de bactérias intracelulares recuperadas}) / (\text{número de bactérias inoculadas})$.

8.5 Anexo E: Microscopia de varredura mostrando a cepa A2363 aderindo na célula eucariótica EAhy926 através de estruturas filamentosas.

