

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



CLÁUDIA DE MOURA

**“IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS FLAGELARES E  
VARIAÇÃO DE FASE EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli*  
ISOLADAS DE ANIMAIS E ALIMENTOS”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Cláudia de Moura  
D. Leite  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada no Instituto de biologia para obtenção do título de doutor em Genética e Biologia Molecular na área de Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

<b>M865i</b>	<p>Moura, Cláudia de Identificação de novos antígenos e variação de fase em amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de animais e alimentos / Cláudia de Moura – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientador: Domingos da Silva Leite. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Escherichia coli</i>. 2. Flagelos (Microbiologia). 3. Sorologia. 4. Variação antigênica. I. Leite, Domingos da Silva, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	---

**Título em inglês:** Identification of new flagellar antigen and phase variation in *Escherichia coli* isolated from animals and food.

**Palavras-chave em inglês:** *Escherichia coli*; Flagella (Microbiology); Serology; Antigenic variation.

**Área de concentração:** Microbiologia.

**Titulação:** Doutora em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Domingos da Silva Leite, Fabiana Fantinatti Gaborggini, Marcelo Lancelotti, Gleize Vilella Carbonell, Adriana Hamond Régua Mangia.

**Data da defesa:** 14/12/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 14 de dezembro de 2010.

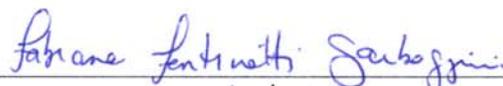
Banca Examinadora

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite



Assinatura

Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Gaborggini



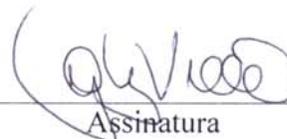
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancelotti



Assinatura

Profa. Dra. Gleize Villela Carbonell



Assinatura

Profa. Dra. Adriana Hamond Regua Mangia



Assinatura

Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

Assinatura

Profa. Dra. Cleide Catani

Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano

Assinatura

*“Somos feitos de carne, mas temos que viver como se fôssemos  
feitos de ferro”  
Sigmund Freud*

*Dedico este trabalho  
à memória póstuma de  
Mário R. C. de Moura e Andréia,  
aos que mais me incentivaram.  
Saudades...*

## **Agradecimentos**

A Deus,

Agradeço à minha mãe, Dusolina R. de Moura, por tudo que fez por mim e continua fazendo, sempre incentivando e acreditando na realização de meus objetivos. Espero ser digna do orgulho que você tem de mim;

Ao meu companheiro Henrique, por dizer que me ama todos os dias, por ter me dado além de seu amor, o maior presente que jamais pudesse imaginar, por todos estes anos que estamos juntos, na alegria e na tristeza, saúde e doença. Te amo, te amo, te amo!;

Ao meu filho Ícaro, querido, que resolveu chegar no meio dessa loucura toda de pós graduação e encher minha vida de alegria, pelas “conversas” antes de dormir, por assistir tantas vezes o DVD do Cocoricó juntos, brincar na areia, bagunça de comida, brincar de roda-roda, me fazer esquecer os problemas, me dar um beijo sem saber porquê, ouvir todo dia sua voz me chamando de mãe;

Ao meu orientador Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pela orientação, companheirismo, ensinamento e pela amizade que construímos ao longo dos anos;

À Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, por tudo que fez por mim, pelas conversas descompromissadas, pelos cafezinhos logo de manhã, pela preocupação e amizade, ensinamentos, sabedoria, respeito e ajuda. Uma mulher admirável;

Ao pesquisador do CBMEG Prof. Dr. Márcio José da Silva e a aluna Aline Lima, pelo apoio nos experimentos de RT-PCR e sequenciamento;

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pelo apoio nos experimentos de sequenciamento;

Aos meus amigos queridos, Fabi, Mateus, Thais, Juninho, Fer, Ricardo, Cristina, Nardão... são tantos amigos, tanto apoio, meus irmãos do coração eu agradeço;

Especial a comadre Fabiana e compadre Vitor, Cileide e Hudson pela dedicação à nossa amizade, por amar meu filho como se fosse seus, por me dar apoio, incentivar meus estudos. Sem o apoio de vocês não chegaria viva no final desta jornada;

Ao Tico, Dasha, Jade, Fluffy e Molay (in memorian), pois quando eu estava mais cansada e nervosa vocês só se sentavam ao meu lado, sem se mover, me dando apoio moral;

Ao Prof. Dr. Flavio Alterthum, pela sua enorme sabedoria, bom senso, gentileza e pela oportunidade de trabalharmos juntos na Faculdade de Medicina de Jundiaí;

À biomédica Ana Lucia G. Galastri, da Faculdade de Medicina de Jundiaí, pelo trabalho que realizamos juntas, pela ajuda, competência e amizade;

À minha avó Emilia, pois fez até promessa pra eu poder terminar o doutorado e arrumar emprego;

Aos amigos e companheiros de laboratório, que já terminaram o trabalho e foram embora, aos que chegaram para pós graduação, iniciação científica e aperfeiçoamento, são tantos que não caberia no papel. Agradeço todos os momentos que passamos juntos;

Aos alunos e funcionários do laboratório de Antígenos Bacterianos I e Laboratório de Virologia, pela ajuda nos experimentos, empréstimos de materiais, correção de textos, etc, etc, etc;

Agradeço especial à Dra. Monique Ribeiro Tiba e Dra. Maria Clara Duarte Fregolente pela ajuda laboratorial, técnicas e discussões sobre nosso trabalho, amizade e apoio;

Ao pesquisador Luciano Moura Martins, pela ajuda, leitura de manuscrito, amizade e gentileza;

À bióloga Mirtis, por todo apoio que me deu, técnico e moral, pela amizade que construímos e “dicas” valiosas. Uma amiga pra guardar pra sempre;

Ao amigo Geórgio, pelas conversas, dicas de experimentos e amizade;

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, por todo apoio;

À minha sogra Maria, meu sogro Milton, meus cunhados e sobrinhos, pelo apoio, amizade e ajuda com meu filho quando mais precisei;

À minha família, tios, primos, pelo carinho e ajuda;

À subcomissão e coordenação da CPG-GBM, principalmente à Lourdes, por toda ajuda que me deu;

À CAPES pelo apoio financeiro com a bolsa de doutorado;

À FAPESP pelo apoio financeiro do projeto;

E a todos que diretamente ou indiretamente auxiliaram no meu trabalho.

PS: Se eu esqueci de alguém, por favor me desculpe, estava de cabeça cheia!!

## Índice

<b>Lista de Quadros</b> .....	x
<b>Lista de Tabelas</b> .....	xi
<b>Lista de Figuras</b> .....	xii
<b>Resumo</b> .....	xiii
<b>Abstract</b> .....	xiv
<b>I) Introdução</b> .....	15
1. <i>Escherichia coli</i> .....	16
2. Motilidade e patogênese.....	23
3. <i>Escherichia coli</i> patogênica em animais e alimentos.....	20
4. Flagelo.....	24
5.1. Estruturas Flagelares.....	25
5.1. Corpo Basal.....	25
5.2. Gancho.....	27
5.3. Filamento Flagelar.....	28
6. Genes envolvidos na síntese flagelar.....	32
7. Montagem do flagelo.....	34
8. Variação de fase.....	37
9. Sorologia e técnicas moleculares para determinação dos antígenos H em <i>E. coli</i> .....	40
<b>II) Objetivos</b> .....	43
<b>III) Material e Métodos</b> .....	45
1. Amostras de <i>Escherichia coli</i> .....	46
1.1. Amostras padrão para o antígeno flagelar “H”.....	46
1.2. Amostras de campo H não - tipável (HNT).....	46
2. Extração de DNA de <i>E.coli</i> .....	48
3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	48
3.1. PCR do gene <i>fliC</i> de amostras de <i>E.coli</i> .....	48
3.2. Iniciadores utilizados para o estudo da variação de fase.....	49
3.3. PCR para detecção dos genes de variação de fase flagelar de em <i>E. coli</i> .....	50
3.4. Eletroforese em gel de agarose.....	50
4. Digestão enzimática dos amplicons de <i>fliC</i> (PCR-RFLP).....	51
4.1. Concentração dos produtos de PCR.....	51
4.2. Reações de digestão enzimática para verificação do Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP).....	51
4.3. Análise dos resultados da eletroforese em gel de agarose.....	52
5. Sequenciamento.....	52
5.1. Sequenciamento pela técnica de <i>cromossomo walking</i> .....	52

5.2. Construção dos iniciadores externos para os genes <i>fljA</i> , <i>flmA</i> e <i>fliC</i> de <i>E.coli</i> .....	53
6. Preparação e obtenção do antígeno “H” das amostras HNT de <i>E.coli</i> .....	55
6.1. Obtenção dos antígenos H padrão e HNT (não tipáveis).....	55
6.2. Obtenção de antissoros anti-HNT.....	55
7. Ensaio de sorologia em mostras HNT de <i>E.coli</i> .....	55
7.1. Determinação do título dos antissoros anti-HNT .....	55
7.2. Absorção de antissoros anti-HNT .....	56
8. Reação de variação de fase; fase reversão.....	56
9. RT-PCR.....	57
9.1. Detecção do RNAm dos genes de expressão de variação de fase flagelar.....	57
9.2. Extração do RNA total.....	57
9.3. Síntese do cDNA.....	58
9.4. Reação de RT-PCR.....	58
<b>IV) Resultados</b> .....	60
1. Perfil sorológico das amostras de <i>Escherichia coli</i> HNT (não tipável).....	61
2. PCR.....	61
2.1. PCR do gene <i>fliC</i> de amostras de <i>E. coli</i> padrão de antígeno H.....	61
2.2. PCR das amostras de <i>E. coli</i> com perfil de antígeno HNT (não tipável).....	63
3. RFLP.....	64
3.1. Detecção de polimorfismo e perfis de restrição do gene <i>fliC</i> de <i>E. coli</i> padrão e <i>E. coli</i> HNT.....	64
3.2. Análise do perfil de restrição das amostras de <i>E.coli</i> H padrão e amostras HNT....	71
4. Sequenciamento do gene <i>fliC</i> das amostras de <i>E. coli</i> HNT.....	76
4.1. Sequenciamento parcial do gene <i>fliC</i> das amostras de <i>E. coli</i> HNT.....	77
4.2. Sequenciamento total do gene do gene <i>fliC</i> .....	79
5. PCR para detecção dos genes de variação de fase em <i>E. coli</i> HNT e amostras de <i>E.coli</i> H padrão.....	88
6. Sequenciamento dos genes relacionados à variação de fase flagelar em <i>E. coli</i> HNT e amostras padrão.....	90
7. Indução da variação de fase .....	96
8. Produção de antissoros das amostras de <i>E. coli</i> HNT não caracterizadas por metodologia molecular.....	97
8.1. Indução da variação de fase com antissoros contra os antígenos H de <i>E.coli</i> HNT.....	99
9. Detecção do RNAm dos genes <i>fliC</i> , <i>fljA</i> e <i>flmA</i> através de RT-PCR.....	100
<b>V) Discussão</b> .....	102
<b>VI) Conclusões</b> .....	116
<b>VII) Referências bibliográficas</b> .....	119
<b>V) Anexos</b> .....	129

## Lista de Quadros

Quadro 1- Amostras de <i>Escherichia coli</i> padrão para antígeno flagelar (H).....	46
Quadro 2 - Amostras de <i>E. coli</i> com antígeno H não tipável (HNT).....	47
Quadro 3 - Iniciadores utilizados para reações de PCR para detecção do gene <i>fliC</i> de <i>E. coli</i> .....	49
Quadro 4: Iniciadores utilizados para detecção dos genes <i>fljA</i> , <i>flkA</i> e <i>flmA</i> de <i>E. coli</i> .....	50
Quadro 5 - Iniciadores dos genes de variação de fase em <i>Escherichia coli</i> utilizados no sequenciamento para amplificação das extremidades dos genes e montagem dos contigs..	54
Quadro 6 - Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR para detecção do RNAm dos genes <i>fliC</i> e de variação de fase.....	59

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Perfil sorológico das amostras de <i>E. coli</i> isoladas de animais e alimentos que apresentam perfil HNT (não tipável).....	61
Tabela 2: Tamanho dos produtos da PCR utilizando os iniciadores FliC(M) e FliC(F) para o gene para antígenos H de amostras de <i>E.coli</i> padrão.....	62
Tabela 3 - Tamanho do produto da PCR para o gene H de amostras de <i>E.coli</i> HNT utilizando os iniciadores FliC(M) e FliC(F).....	63
Tabela 4: Resultados do polimorfismo da PCR-RFLP, utilizando os iniciadores FliC(F) e FliC(M) para o gene <i>fliC</i> de <i>Escherichia coli</i> H padrão.....	66
Tabela 5: Produtos amplificados com o iniciador FliC(M) e resultados da digestão enzimática utilizando a endonuclease de restrição <i>HhaI</i> em amostras de <i>E. coli</i> isoladas de animais e alimentos.....	68
Tabela 6: Produtos amplificados com iniciador FliC(F) e resultados da digestão enzimática utilizando a endonuclease de restrição <i>RsaI</i> em amostras de <i>E. coli</i> isoladas de animais e outras fontes.....	70
Tabela 7: Perfis das amostras de <i>E. coli</i> HNT e amostras padrão para o antígeno H obtidos por PCR-RFLP e resultados de sorologia com antissoros H padrão.....	75
Tabela 8: Amostras de <i>E. coli</i> caracterizadas por PCR-RFLP e sequenciamento de <i>fliC</i> .....	88
Tabela 9: Sorologia das amostras de <i>E. coli</i> HNT submetidas à de variação de fase flagelar..	96
Tabela 10: Títulos dos antissoros produzidos para <i>E. coli</i> HNT frente aos antígenos H padrão e antígenos de <i>E.coli</i> HNT.....	98
Tabela 11. Títulos dos antissoros produzidos para <i>E. coli</i> HNT frente aos antígenos H padrão e antígenos de <i>E.coli</i> HNT após reação de absorção.....	99
Tabela 12: Cultivo da amostra de <i>E. coli</i> HNT 4C para verificar a expressão da variação de fase flagelar.....	100
Tabela 13: RT-PCR para detecção de RNAm em amostras <i>E. coli</i> 3C e 4C positivas para os genes de variação de fase.....	101

## Lista de Figuras

Figura A: Componentes flagelares de <i>Salmonella enterica</i> . Fonte: Chevance & Hughes (2008).....	25
Figura B. Perfis eletroforéticos dos amplificadores obtidos com os iniciadores FliC(M) com a enzima <i>HhaI</i> , nas amostras de <i>E. coli</i> H padrão, gerado pelo programa GELCOMPARE II. PM50pb – padrão de peso molecular de 50 pb; dig – digerido.....	65
Figura C- Perfis eletroforéticos da RFLP obtidos com os iniciadores FliC(F) com a enzima <i>RsaI</i> , nas amostras de <i>E. coli</i> H padrão, gerado pelo programa GELCOMPARE II. PM100pb - padrão de peso molecular de 100 pb; dig – digerido.....	67
Figura D: Perfil eletroforético dos amplificadores das amostras HNT analisados pelo programa Gel Compar II utilizando o iniciador FliC(M) e a endonuclease de restrição <i>HhaI</i> . Na imagem superior foi utilizado padrão de peso molecular de 50pb (Invitrogen) e na imagem inferior padrão de 100pb (Fermentas).....	69
Figura E: Perfil eletroforético dos amplificadores de amostras HNT analisados pelo programa Gel Compar II utilizando o iniciador FliC(F) e a endonuclease de restrição <i>RsaI</i> . Utilizamos como padrão de peso molecular o marcador de 100pb (Fermentas). As amostras estão nomeadas como amostra a legenda à direita.....	71
Figura F: Resultados da análise de similaridade entre os produtos PCR-RFLP obtidos com os iniciadores FliC(F) e com a enzima <i>RsaI</i> em amostras H padrão e <i>E.coli</i> isoladas de animais e alimentos gerados pelo programa GEL COMPARE II. PM100pb – padrão de peso molecular de 100 pb; dig – digerido.....	73
Figura G: Resultados da análise de similaridade entre os produtos PCR-RFLP obtidos com os iniciadores FliC(M) e com a enzima <i>HhaI</i> em amostras H padrão e <i>E.coli</i> isoladas de animais e alimentos, gerados pelo programa GEL COMPARE II. PM100pb – padrão de peso molecular de 100 pb; dig – digerido.....	74
Figura H: Perfil eletroforético da PCR dos genes de variação de fase em amostras de <i>E.coli</i> H padrão. PM: padrão de peso molecular 1Kb (Fermentas). 1: amostra H3 FljA negativo; 2: amostra H53 + FljA; 3: amostra H54 + FljA; 5/6: amostra H3 com iniciador FlkA3; 8/9: amostra H53 com iniciador FlkA53; 11/12: amostra H54 com iniciador FlmA 54.....	89
Figura I: Produtos amplificadores nas reações de RT-PCR para detecção de RNAm. 1- PPM. Para a amostra 4C cultivada com antissoro anti-H48: 2-16S1; 3- <i>fliC</i> <sub>4C</sub> ; 4- <i>fljA</i> ; 5- <i>flmA</i> ; 6 - <i>fliC</i> <sub>H48</sub> negativo; 7- controle negativo. Amostra 4C cultivada com antissoro anti-H54: 8- 16S1; 9- 16S2; 10- <i>fliC</i> <sub>H48</sub> ; 11- <i>fliC</i> <sub>4C</sub> ; 12- <i>fljA</i> negativo; 13- <i>flmA</i> negativo. Amostra 4C cultivada com antissoros anti-h48+anti-H54: 14- 16S1; 15- 16S2; 16- <i>fliC</i> <sub>H48</sub> negativo; 17- <i>fliC</i> <sub>4C</sub> ; 18- <i>fljA</i> negativo; 19- <i>flmA</i> negativo; 20- PPM.....	101

## RESUMO

### “Identificação de novos antígenos flagelares e da variação de fase em amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais e alimentos”

*Escherichia coli* é um membro comensal da microbiota de animais, porém podem causar doenças desde diarreias até sepses. A caracterização dos seus antígenos de superfície O (somático) e H (flagelar) auxilia na determinação de linhagens patogênicas dentro da espécie. Contudo, algumas bactérias não expressam flagelo *in vitro*, demonstrando que a amplificação do gene *fliC*, a análise dos fragmentos de polimorfismo (PCR-RFLP) e sequenciamento podem ser utilizadas para identificação dos antígenos H, em substituição à sorologia convencional. Até meados de 1980, pensava-se que, diferentemente da *Salmonella*, *E. coli* possui um único gene para expressão de flagelina (*fliC*), mas algumas amostras podem conter genes para expressão de flagelina *flkA*, *flaA*, *flmA*, *flnA* e *fljA* (repressor de *fliC*). Em nosso trabalho, analisamos 31 amostras de *E. coli* isolados de animais e alimentos que apresentavam o fenótipo HNT em ensaios de sorologia. Utilizamos PCR-RFLP e sequenciamento para descrever novos genes para flagelina, da qual foram obtidos antissoros. Identificamos por PCR e sequenciamento os genes responsáveis pela variação de fase *fljA*, *flkA* e *flmA*, realizamos experimentos de motilidade para determinar a variação de fase flagelar e detectar a expressão dos genes através de RT-PCR. Dezesete amostras tiveram seus antígenos H caracterizados, sendo nove caracterizadas por PCR-RFLP: H2 (duas amostras) H16 (duas amostras), H34 (três amostras), H33 (uma amostra) e H38 (uma amostra). Na análise de sequenciamento identificamos duas amostras portadoras do gene *fliC<sub>h25</sub>*, duas amostras *fliC<sub>h7</sub>* e uma amostra apresentando *fliC<sub>h32</sub>*. Três novos genes para flagelina foram descritos: *fliC<sub>h2'</sub>*, *fliC<sub>4c</sub>*, *fliC<sub>40c</sub>*. Identificamos o gene *fljA* em duas amostras HNT (3C e 4C) e na amostra padrão H35. O gene das amostras HNT apresentaram homologia ao *fljA* de *Salmonella enterica*, cuja variação de fase é bem estabelecida. As amostras padrão H11, H35, H40 e H47, bem como as amostras HNT 3C e 4C foram positivas para o gene *flmA*. As amostras padrão H3 e H53 são portadoras do gene *flkA*, contudo apenas a amostra H53 apresentou *fljA*. A amostra H54 é portadora de *fljA* e *flmA*. Nenhuma amostra H padrão mostrou variação de fase, diferentemente da literatura, sugerindo a perda da capacidade de variar a fase flagelar. A amostra 4C mostrou variação de fase positiva quando induzida em meios de cultura contendo antissoros anti-H48, anti-H54 e anti-H4C. Do mesmo modo, a detecção dos RNAm em diferentes condições de cultura confirmou a variação de fase. Como resultado um esquema de identificação para detecção de grupos de antígenos H e identificação de *fliC* foi testado. A técnica de *fliC*-RFLP provou ser eficiente e rápida, auxiliando a sorologia clássica para detecção de antígenos H de *E. coli*. Um modelo geral de variação de fase da amostra 4C é expresso por  $fliC^{off} + flmA^{on} \rightarrow fliC^{on} + flmA^{off}$ . Além disso, nós verificamos que a amostra 4C apresenta um gene novo para expressão de flagelina. Este trabalho é pioneiro em relação à variação de fase flagelar, demonstrando uma nova associação entre os antígenos H48 e H54.

## ABSTRACT

### “Identification of new flagellar antigens and the phase variation in *Escherichia coli* isolated from animals and foods”

*Escherichia coli* are a species of microflora, and characterization of the cell surface lipopolysaccharide O antigen and the flagellar H antigen allow the grouping of pathogenic clones within this species. Moreover, some bacteria *in vitro* do not obtain to express its flagella, demonstrated that PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and sequencing analysis has been used for the identification of these antigens, in substitution of traditional serology. Moreover, until middle of years 80, are believed, differently of the *Salmonella*, *E. coli* possess an only gene for flagelin expression (*fliC*), but some s/strains can contain genes for flagellin expression *flkA*, *flhA*, *flmA*, *flnA* and *fljA* (repressor of *fliC*). In this work, we analyzed 31 strains of *E. coli* isolated from animals and foods that presented HNT phenotype in serology assays. We use PCR-RFLP and sequencing to describe new genes for flagellin, of which antiserum were obtained. We identify for PCR and sequencing the genes for phase variation *fljA*, *flkA* and *flmA*, we carry through motility experiments to determine the flagellar phase variation and to detect the expression of the genes (RNAm) through RT-PCR. Seventeen strains had had its H antigen characterized and nine of them were characterized for PCR-RFLP: H2 (two strains) H16 (two strains), H34 (three strains), H33 (one strain) and H38 (one strain). Through sequencing analysis we identify to two carrying strains of the gene *fliC<sub>h25</sub>*, two strains *fliC<sub>h7</sub>* and one strain presenting *fliC<sub>h32</sub>*. Three new genes for flagellin had been described: *fliC<sub>h2</sub>*, *fliC<sub>4c</sub>*, *fliC<sub>40c</sub>*. Using PCR and sequencing, we identify *fljA* gene in two strains HNT (3C and 4C) and in the H35 control strain. The HNT genes showed homology to *fljA* of *Salmonella enterica*, whose variation of phase well is established. The control strains H11, H35, H40 and H47, as well as HNT 3C and 4C strains were positive for *flmA* gene. The control strains H3 and H53 are carrying of *flkA* gene, however only the H53 strain presented *fljA*. The H54 control strain is carrying of *fljA* and *flmA*. No H control strain showed phase variation, differently of literature, suggesting the loss of the capacity to flagellar phase variation. The 4C strain showed positive phase variation when cultured with antiserum anti-H48, anti-H54 and anti-H4C. In a similar way, the detention of RNAm in different conditions of culture confirmed the phase variation. As a result, an identification scheme was tested to deduce H antigen groups and new genes of *fliC*. The *fliC*-RFLP technique proved to be faster than classic serotyping for the deduction of the *E. coli* H antigen, characterizing the antigens with few days and indicating new putative genes. Thus, a general model for flagellar phase variation in 4C strain can be expressed as  $fliC^{off} + flmA^{on} \rightarrow fliC^{on} + flmA^{off}$ . In addition, we found that strains 3C and 4C express unidentified flagellin antigens. This is the first report of flagellar phase variation in wild *E. coli* strains. We have also provided evidence that strain 4C, identified here for the first time, expresses three flagellar antigens, H48, H54 and a previously unidentified flagellin.

## **I) INTRODUÇÃO**

---

## D) INTRODUÇÃO

### 1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli*, a espécie predominante na microbiota anaeróbica facultativa do intestino de animais homeotérmicos, desempenha um importante papel na manutenção da fisiologia intestinal (Gyles, 1994). Alguns isolados são patogênicos e podem causar infecções entéricas (diarréia, disenteria, colite hemorrágica, uremia hemolítica e doença do Edema) (Levine, 1987; Lior, 1994; Nataro & Kaper, 1998) ou extra-intestinais (infecções do trato urinário, sepses, meningites, peritonites, infecções pulmonares) no homem e animais (Ørskov & Ørskov, 1985). Este bacilo apresenta uma natureza tanto patogênica quanto comensal, além de possuir um alto grau de diversidade genética ocasionada por mutações, recombinações e transferências horizontal de DNA (Baldy-Chudzik & Stosik, 2007).

O habitat de *E.coli* é a mucosa intestinal de mamíferos. Neste nicho a bactéria caracteriza-se por ser um competidor. Entretanto, há isolados de *E.coli* altamente adaptados, que têm adquirido atributos de virulência específicos que conferem a habilidade de se adaptar a novos nichos e então causar um grande espectro de doenças. A necessidade de diferenciar entre a *E.coli* comensal da patogênica levou ao desenvolvimento de ensaios bioquímicos que se tornou a base da taxonomia moderna bacteriana (Sussman, 1997).

Em 1947, Kauffmann propôs uma forma de diferenciar *E. coli* com base na determinação dos seus antígenos superficiais “O” (somático), “K” (capsular) e “H” (flagelar) que por convenção foram identificados por números arábicos colocados em seguida a cada letra do antígeno estudado, permitindo numerosas combinações O:K:H. Esta forma de classificação sorológica se mostrou muito útil nos estudos epidemiológicos e de patogênese da *E. coli* (Ørskov *et al.*, 1975; Nataro & Kaper, 1998). Ainda, a presença destes antígenos em combinações variadas tem

permitido estabelecer a correlação de isolados de *E.coli* com algumas doenças, principalmente com as enteropatias.

Há seis categorias de *E.coli* diarreogênicas descritas atualmente (Kaper *et al.*, 2004):

- a) *E. coli* Enteropatogênica (EPEC) associada a surtos de diarreia infantil em países em desenvolvimento, são capazes de produzir a lesão A/E (*attaching and effacing*) e está associada à adesão íntima às células epiteliais intestinais e acarreta mudanças no citoesqueleto celular. As microvilosidades intestinais formam estruturas parecidas com “pedestais”, a qual a bactéria se adere na mucosa. A habilidade de induzir o A/E é codificada pelo gene *eae* na ilha de patogenicidade chamada de “*locus enterocyte effacement*” (Nataro & Kaper, 1998). Esse gene codifica proteína chamada intimina, que é responsável pela junção íntima de EPEC às células epiteliais. Essa proteína também é encontrada em *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC). A adesão destas linhagens está associada ao plasmídeo EAF que codifica pili do tipo IV denominado BFP (*bundle-forming pilus*), que estabilizam a bactéria em microcolônias (Kaper *et al.*, 2004). As linhagens EPEC típicas possuem o gene *eae* e o plasmídeo EAF. As estirpes atípicas detêm somente o gene *eae* (Kaper *et al.*, 2004);
- b) *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), está associada a epidemias e graves síndromes clínicas como colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica. Caracteriza-se pela produção de Shiga-Toxinas (Stx1 e Stx2) ou verocitotoxina (VT). Em adição, os isolados de EHEC também contêm a ilha de patogenicidade LEE (*Locus of enterocyte effacement*) que codifica um sistema de secreção do tipo III, homólogo ao sistema produzido pela EPEC. *E. coli* EHEC sorotipo O157:H7 é reconhecida como causa emergente de doença entérica e insuficiência renal (síndrome urêmica) em humanos. Esta classe possui citotoxinas, plasmídios e fatores de colonização (Nataro & Kaper, 1998). As Verotoxinas

produzidas por EHEC inibe a síntese protéica, produz efeito citopático *in vitro* em células Vero e são também denominadas de verotoxinas (VTs) ou Shiga-like toxinas (STxs), alterando fatores de coagulação sanguínea. Também causa lesão A/E (*attaching and effacing*) e colonizam preferencialmente o cólon (Kaper *et al.*, 2004). A infecção pelo sorotipo O157:H7 culmina com grave quadro de colite hemorrágica, trombocitopenia e síndrome urêmica hemolítica, frequentemente fatal em crianças e indivíduos debilitados. A espécie bovina é reconhecida como a principal reservatório deste sorotipo e é a maior fonte de infecção, que é eliminado pelas fezes de bovinos com e sem sinais entéricos (Kaper *et al.*, 2004).

- c) *E.coli* Enterotoxigênica (ETEC), expressa enterotoxinas termoestáveis (ST) e/ou termolábeis (LT), assim como diferentes fatores de colonização do hospedeiro: CFA (*colonization factor antigen*), CS (*coli surface antigen*) ou PCF (*putative colonization factor*). Está associada à diarreia aquosa em crianças e à diarreia dos viajantes nos países em desenvolvimento. As LTs são enterotoxinas parecidas com a toxina colérica, produzida pelo *Vibrio cholerae*. Essa toxina altera a atividade da adenilciclase ativando canais de cloro, levando à saída de água e à diarreia. LT é encontrada predominantemente em isolados humanos. As STs são divididas em STa e STb, codificadas em plasmídio e diferem na estrutura e no mecanismo de ação. A toxina STa é associada à doença em humanos e animais. Após a ligação da toxina com o receptor guanilil-ciclase, ocorre estimulação da atividade de guanil-ciclase, levando ao aumento intracelular de cGMP que determina aumento nas secreções. A STb é associada a doenças em animais. Essa toxina eleva a concentração citosólica de  $Ca^{+2}$  estimulando a liberação de prostaglandina E2 e liberação de serotonina, levando ao aumento na secreção de íons e diarreia;

- d) *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), apresenta um padrão de adesão *in vitro* do tipo agregativo às células Hep-2 e HeLa, possuindo uma fimbria de aderência agregativa (AAF - *aggregative adherence fimbriae*) e secreta a enterotoxina EAST-1 (*enteroaggregative E. coli ST*) e PET (*plasmid encoded toxin*). Ocasiona diarreia em crianças e adultos tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. A EAST-1 altera a corrente iônica das células intestinais, enquanto que a PET induz o rompimento da membrana celular. A colonização ocorre predominantemente no cólon, seguida por secreção de enterotoxinas e citotoxinas. Clinicamente caracteriza-se por diarreia aquosa, com curto período de incubação, febre branda e vômitos. A “diarreia do viajante” também tem sido associada com esta categoria de *E. coli* diarreiogênica;
- e) *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), possui propriedades bioquímicas, genéticas e patogênicas semelhantes à toxina produzida pelo gênero *Shigella*. A EIEC penetra nas células epiteliais do cólon, se multiplica e invade as células adjacentes causando inflamação e sinais de diarreia aquosa, com presença de muco e sangue, febre, mal estar e cólica. A infecção por EIEC é mais freqüente em crianças com mais de dois anos de idade e em adultos. A transmissão é via fecal-oral e ocorre por ingestão de água ou alimentos contaminados. Os humanos são reservatórios desta categoria de *E. coli* diarreiogênica. Os genes requeridos para a patogenicidade de EIEC estão presentes em plasmídeo que codifica um sistema de secreção do tipo III, responsável pela secreção das proteínas IpaA, IpaB, IpaC e IpgD. Estas proteínas determinam rearranjos no citoesqueleto e lise dos vacúolos endocíticos dos enterócitos.
- f) *E. coli* Aderência difusa (DAEC), é definida pela presença do padrão de aderência difusa em células HEp-2 *in vitro*. DAEC têm sido associadas à casos de diarreia particularmente

em crianças maiores de 12 meses de idade. A adesina fimbrial F1845 foi observada em aproximadamente 75% dos casos.

***E.coli* Extraintestinal Patogênica (ExPEC):** as infecções em humanos ocorrem em todas as faixas etárias e podem acometer diversos órgãos. Como IEs típicas merecem destaque as ITUs por *E. coli* uropatogênicas (UPEC), meningite/ou sepse (MNEC) especialmente em neonatos, infecções intra-abdominais, pneumonia, osteomielite e infecções em tecidos moles (KAPER *et al.*, 2004).

Diferentes fatores de virulência de *E. coli* tem sido investigados em linhagens entéricas e extra-entericas. Dentre estas propriedades de virulência assumem destaque as adesinas, fímbrias, citotoxinas e mecanismos quelantes de ferro. Adesinas são proteínas localizadas na superfície bacteriana, que promovem a ligação específica com receptores presentes em células eucarióticas, determinada por estruturas protéicas denominadas fímbrias, pili ou por adesinas não fimbriais. As fímbrias são compostas por proteínas “ancoradas” dentro da membrana da bactéria (Johnson & Russo, 2002).

## **2. *Escherichia coli* patogênica em animais e alimentos**

A infecção por *E. coli* está muito relacionada a fatores ligados à integridade física do animal e seu manejo. Entre os fatores mais considerados estão: a idade do animal, a vitalidade do animal ao nascer e a sua imunidade. A sensibilidade à agentes infecciosos está diretamente ligada à idade do animal. É considerado como o período de maior risco as três primeiras semanas de vida e dentro deste período, a maior incidência de casos de diarreia está na segunda semana de vida (Garcia *et al.*, 1999).

Existem três maneiras distintas de manifestação de colibacilose entérica em suínos: a) neonatal, que ocorre em leitões de 1 a 4 dias e geralmente os leitões são encontrados mortos. As *E. coli* colonizam o epitélio do intestino sendo a adesão das bactérias favorecida pela fimbria F4 (K88) nas microvilosidades das células epiteliais seguindo-se da produção de enterotoxinas; b) enterite do desmame, onde os leitões afetados desenvolvem diarreia, depressão, anorexia e febre que pode persistir durante 2 a 3 dias; c) Doença do edema, que ocorre em leitões, os quais são os mais afetados, embora suínos de qualquer idade podem ser acometidos. Wilson & Francis (1986) e Casey *et al.* (1992) descreveram cinco diferentes tipos principais de fimbrias: K88, K99, 987P, F18 e F41 em isolados de ETEC de origem suína. A colonização bacteriana e quadro clínico aparente da infecção são restritos a idade e linhagem do animal, ou seja, leitões lactentes são infectados mais freqüentemente por cepas possuidoras de determinadas fimbrias como 987P e F41, por apresentarem receptores específicos em enterócitos, nessa faixa etária (Francis *et al.*, 1986).

Em ovinos, a colibacilose ocorre em cordeiros na forma entérica e bacteriêmica. A forma entérica ocorre em cordeiros de 2 a 8 dias de vida. É causada pela proliferação da *E. coli* no intestino. Cordeiros com colibacilose entérica apresentam diarreia, depressão e alguma mortalidade. A forma bacteriêmica freqüentemente resulta em morte. Manifestações menos severas incluem meningite e artrite

Já em bovinos, a doença entérica (white scour) em terneiros é uma doença muito freqüente e séria na primeira semana de vida dos bovinos. Ocorre em todas as raças de leite e de corte. O aparecimento da doença ocorre mais em animais que estão confinados. A primeira descrição de *E. coli* como agente causador da diarreia foi feita por Smith & Halls em 1967 envolvendo ETEC como causa de diarreia em bezerros. Dentre os fatores de colonização relatados associados à colibacilose bovina destacam-se F5 (K99), F41, F17, CS31A, entre outros (Orden *et al.*, 1999),

além da produção de enterotoxinas. Já as EPEC e EHEC podem ser consideradas como enteropatógenos para bezerros de duas a oito semanas de idade. Apesar de EPEC não serem consideradas como produtoras de toxinas, algumas amostras isoladas de casos de diarreia em bezerros produziam uma toxina citoletal distensora (CDT), porém a associação desta toxina com o quadro diarreico ainda não está claro (Clarke, 2001).

O trato-intestinal de ruminantes, particularmente bovinos e ovinos, parece ser o principal reservatório das cepas enterohemorrágicas de *E.coli* O157:H7 e O157:NM. Já foram incriminados em surtos, dentre outros alimentos, leite cru, carne bovina mal cozida e outros produtos à base de carne (rosbifes, hambúrgueres e salsichas tipo “hot-dog”), frutas e vegetais (alface, melão, suco de maçã e diversos tipos de saladas) e maionese industrializada (Silva *et al.*, 2001). No geral, pode-se dizer que a carne bovina é uma das principais fontes potenciais de *E. coli* O157:H7, uma vez que o trato gastrointestinal de bovinos é o reservatório desses micro-organismos. *E. coli* O157:H7 é reconhecida como patógeno de origem alimentar desde 1982, respondendo por milhares de casos de diarreia e síndrome urêmica hemolítica (HUS) nos Estados Unidos, Europa e Japão (Silva *et al.*, 2001).

A *E. coli* é raramente implicada na doença da diarreia aviária. A diarreia vista na colibacilose aviária é o resultado da perda urinária, não sendo sequela de enterite. A típica colibacilose em aves atinge primeiramente o trato respiratório como o resultado da inalação da poeira das fezes contaminadas. O micro-organismo se dissemina na corrente circulatória causando colisepticemia com alta mortalidade. A colibacilose dos pintos recém nascidos, usualmente é originado da contaminação de ovos, através das fezes ou infecção dos ovários das galinhas. As enfermidades em aves pode se apresentar de várias formas, das quais podemos citar a doença crônica respiratória, onfalite, salpingite, septicemias, peritonites, síndrome da cabeça inchada, enterites e celulite (Gross,1994). A fimbria tipo I está envolvida nos estágios iniciais da colisepticemia,

promovendo a colonização de *E.coli* patogênica à traquéia e sacos aéreos das aves (Dozois *et al.*, 1994). A fimbria P, S e F41 são hemaglutininas manose-resistente associada à colisepticemia de frangos de corte, além disso, as hemolisinas e aerobactinas são fatores de virulência relacionados à doença aviária causada por *E. coli* (Dozois *et al.*, 1994).

### **3. Motilidade e patogênese**

A organela de superfície conhecida como flagelo, apresenta aproximadamente 15 µm de comprimento. A atividade flagelar é controlada por um maquinário quimiotático que processa informações químicas e físicas ambientais e controla a movimentação bacteriana (Macnab, 1992; Ramos *et al.* 2004). A motilidade em bactérias está associado à presença de flagelos, sendo que estes podem ser expressos em diferentes números e disposições na célula bacteriana. Podem apresentar apenas um flagelo (monotríqueo) ou dezenas (lofotríquio ou peritríqueo) e todas serão classificadas como móveis nos ensaios fenotípicos (Macnab, 1992).

O flagelo é uma estrutura essencial para o potencial patogênico bacteriano, pois ele proporciona motilidade e aumento da capacidade de adesão da bactéria. O pré-requisito para alguma infecção é o encontro entre a bactéria patogênica e o tecido alvo. Plantas, insetos e mamíferos são todos acometidos por infecções com patógenos flagelados. Em mamíferos, a superfícies de mucosas, especialmente o epitélio, são os principais sítios de interação entre patógeno e o hospedeiro. Bactérias patogênicas produzem flagelo para promover a colonização e invasão de mucosas e secreção de fatores de virulência (Ramos *et al.*, 2004).

A importância do flagelo para adesão e invasão de células epiteliais tem sido demonstrada para inúmeras espécies bacterianas, incluindo *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas spp*, entre outras. O envolvimento do flagelo é demonstrado em espécies oportunistas de *Clostridium difficile*, onde o filamento se liga em receptores nas células da mucosa do ceco de ratos “germ-

free”. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* pode colonizar a mucosa das vias aéreas a uma distância de vários micrômetros através da adesão mediada pelo flagelo. *Escherichia coli* entehemorrágica O157:H7 (EHEC) adere à mucosa intestinal usando um mecanismo dependente de flagelo (Ramos *et al.* 2004).

A motilidade bacteriana alterna entre uma “corrida”, que leva poucos segundos, e uma “cambalhota”, que leva uma fração de segundo. Durante a corrida, o motor flagelar estimula o filamento flagelar a realizar movimentos helicoidais que propela a célula bacteriana. A cambalhota é causada por uma reversão do motor de rotação, que faz com que a célula bacteriana mude o sentido do movimento. Todo o movimento flagelar é estimulado por sinais químicos ambientais, onde a bactéria é atraída ou repelida (Macnab, 1992; Ramos *et al.*, 2004).

#### **4. Flagelo**

O flagelo bacteriano é facilmente reconhecido morfológicamente. Sua estrutura consiste em um filamento externo, que possui subunidades repetidas da proteína flagelina em um arranjo helicoidal, um segmento curto curvado denominado gancho que está localizado externamente à célula e responsável pela junção entre o corpo basal e o filamento, e uma estrutura complexa de anéis e haste central chamada corpo basal, que está ancorada nas membranas interna e externa da célula e é responsável pela rotação do motor e aparato quimiotático (Macnab, 1987; Macnab, 1992; Winstanley & Morgan, 1997). As estruturas flagelares, bem como as proteínas que as compõem estão ilustradas na Figura A.

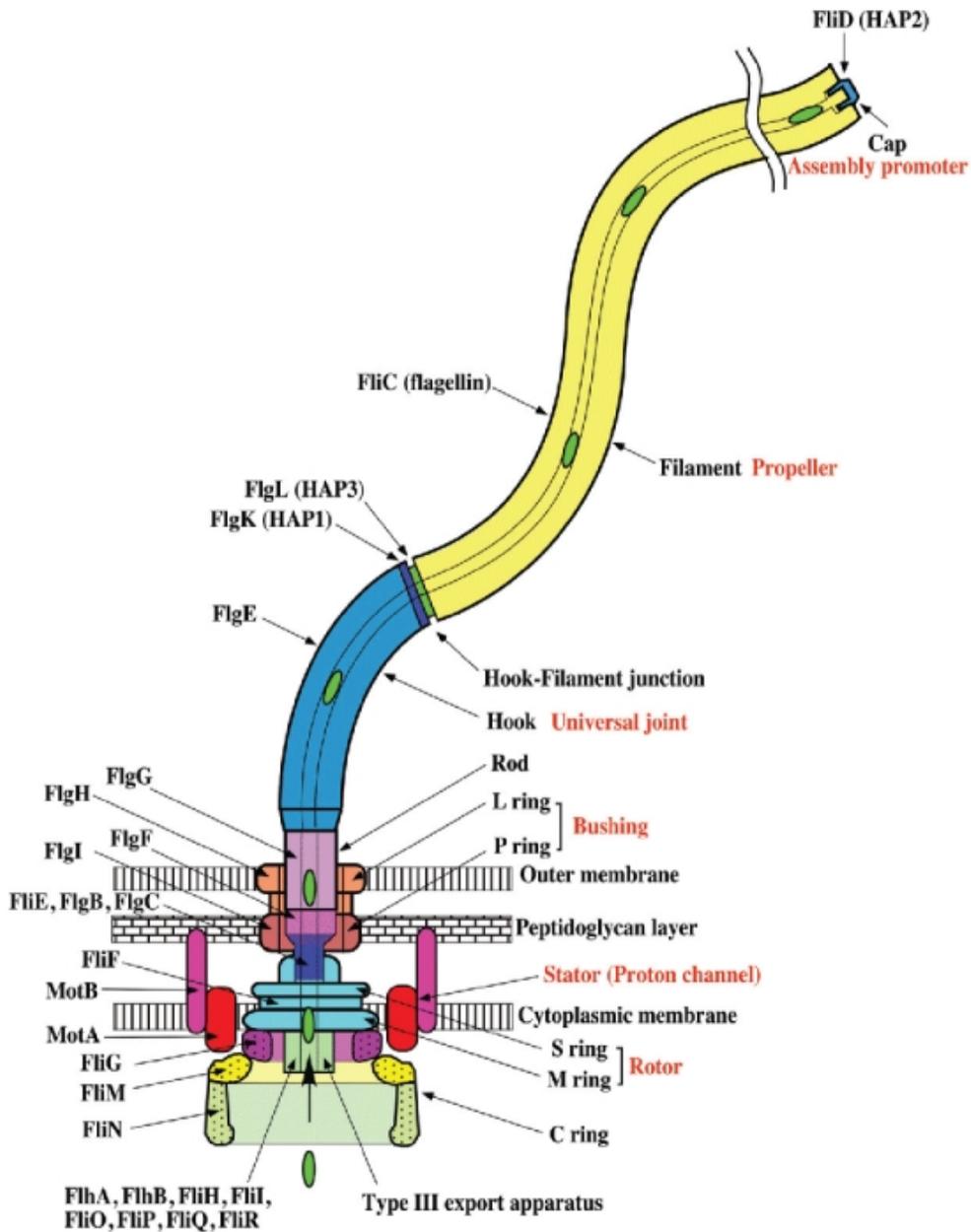


Figura A: Componentes flagelares de *Escherichia coli*.

## 5. Estruturas flagelares

### 5.1. Corpo Basal

O corpo basal corresponde aproximadamente a 1% da massa da organela, contudo é a parte que apresenta maior complexidade. Em bactérias gram-negativas, o corpo basal é composto por quatro estruturas semelhante a anéis, formando um canal central que termina na estrutura

chamada gancho (Silverman & Simon, 1977). Os dois anéis externos (chamados L e P) estão separados, mas parecem ser ligados por uma parede cilíndrica. Os dois anéis internos (S e M) parecem encontrar-se diretamente ao lado dos anéis L e P. Ambas as considerações geométricas e bioquímicas sugerem que na célula intacta, o anel L está no plano da membrana externa (lipopolissacarídeo), o anel P está no plano da camada de peptidoglicano e os anéis S e M estão na membrana celular provavelmente junto a face externa, sendo que o anel M está diretamente associado com a membrana e o anel S está sobre a membrana (Silverman & Simon, 1977).

Um cilindro composto por proteínas que respondem a estímulos quimiotáticos, parte do complexo de anéis, se liga ao complexo de anéis MS que direciona a rotação do motor flagelar, participando do movimento de rotação, propriamente dito. Outro complexo protéico situado na membrana externa bacteriana inclui proteínas do sistema de transporte (sistema de secreção do tipo III), que transportam proteínas axiais produzidas no seu sítio de síntese para dentro de um canal central até seu ponto de montagem. Este transporte direcionado necessita de proteínas chaperonas para atravessar a membrana hidrofóbica, conferindo, então, seletividade ao processo de exportação. As proteínas axiais, proteínas do gancho, junção gancho-filamento e filamento flagelar são transportadas através deste sistema de secreção (Shapiro, 1995).

Associado ao corpo basal, as proteínas MotA e MotB, que são proteínas integrais da membrana celular, são necessárias para a rotação do motor mas não para o movimento de inversão de rotação do motor (sentido horário ou anti-horário), ou montagem do flagelo, pois o corpo basal não contém as proteínas conhecidas por serem importantes para a função do motor. Entretanto, as proteínas MotB podem estar relacionadas à rotação flagelar quando recentemente sintetizada. Estas observações sugerem que proteínas MotA e MotB podem ser arranjadas circunferencialmente ao redor dos anéis S e M (Macnab, 1987).

Além das proteínas MotA e MotB, outras três proteínas não associadas ao corpo-basal (FlaBII<sub>E</sub>/FlaAII.2<sub>S</sub>, FlaAII<sub>E</sub>/FlaQ<sub>S</sub>, e MotD<sub>E</sub>/FlaN<sub>S</sub>) são necessárias para a montagem flagelar e estão envolvidas na rotação do motor e movimento de inversão de rota. Estas proteínas podem estar na periferia da membrana celular, na face citoplasmática do anel M e formam um complexo envolvido na captação de energia e informações sensoriais de quimiotaxia (Macnab, 1987). O domínio carboxil-terminal de MotB está ancorado na parede celular e as quatro hélices hidrofóbicas de MotA interagem com a hélice de MotB atravessando a membrana para formar um canal de prótons. Acima de oito complexos de proteínas Mot estão interagindo com o complexo motor-troca de rota para gerar rotação em resposta a uma corrente interna de prótons (Macnab, 1987).

A energia gerada pela força motora de prótons através da membrana dirige a rotação flagelar. O complexo motor para inversão de rotação (*switch*) é montado na face citoplasmática dos anéis MS e compreende uma estrutura em forma de sino conhecida como anel C. O complexo contém três proteínas (FliG, FliM e FliN) responsáveis pelo movimento de retorcitura e inversão da direção de rota. A parte fixa do motor é constituída por duas proteínas que cercam os anéis MS (Macnab, 1987).

## **5.2. Gancho**

A estrutura externa flagelar é composta por: gancho e filamento flagelar. O gancho liga o filamento flagelar ao corpo basal, apresentando grande flexibilidade e funcionando como uma junção das partes externa e interna do flagelo (Yonekura *et al.*, 2002). A estrutura do gancho está localizada logo após o corpo basal do flagelo e representa somente 1% do total protéico da organela do flagelo (DePamphilis & Adler, 1971; Silverman & Simon, 1977; Macnab, 1987). O gancho tem aproximadamente 900nm de comprimento e diâmetro maior que o filamento flagelar.

Sua composição é de uma única subunidade de polipeptídeos com massa molecular de aproximadamente 42 KDa em *E. coli* e *Salmonella*. Entre o gancho e o filamento estão duas junções ou proteínas acessórias do gancho (HAP1 e HAP3). Ambos os polímeros do gancho e suas subunidades têm propriedades muito diferentes daquelas que compõem o filamento flagelar. As subunidades que compõem o gancho são mais estáveis que as do filamento. Assim, condições de baixo pH, alta concentração de uréia, solventes orgânicos ou qualquer outro agente denaturante que dissocia o filamento flagelar completamente, tem pouco efeito no gancho (Silverman & Simon, 1977).

A parte distal do gancho age como o ponto inicial de crescimento do filamento enquanto a proximal termina como uma roda inserida na membrana celular no corpo basal, dando muito mais estabilidade ao filamento flagelar. Pouco também é conhecido sobre o mecanismo que regula o tamanho do gancho ou sua própria montagem, sendo que seus genes estruturais que controlam a expressão das proteínas do gancho também estão envolvidos no funcionamento flagelar e sua formação propriamente dita (Silverman & Simon, 1977; Macnab, 1992).

Antigenicamente, as proteínas do gancho de *E. coli* e *S. typhimurium* são aparentemente similares, diferentemente da variabilidade antigênica exibida entre os filamentos flagelares dentro das espécies (Macnab, 1987).

### **5.3. Filamento Flagelar**

O filamento flagelar é a estrutura do flagelo que faz o trabalho hidrodinâmico da bactéria no meio. Representa o principal componente em termos de massa e significativamente importante clinicamente em termos de variabilidade antigênica (Macnab, 1992).

Este filamento consiste de uma montagem quaternária de milhares de cópias de uma única proteína, a flagelina. Este filamento longo não apresenta dimensões exatas, variando de 5 a 10

µm de comprimento e aproximadamente 20 nm diâmetro, dependendo do arranjo das subunidades de flagelina (Macnab, 1992). A flagelina de *Salmonella typhimurium* linhagem SJW1103 consiste de 494 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular de aproximadamente 51,5 kDa, sendo tal filamento composto de 11 protofilamentos dispostos lateralmente e 5,5 unidades de maneira helicoidal. Os parâmetros helicoidais variam levemente entre as espécies bacterianas e até entre seus diferentes isolados. Os valores típicos são de 2,0 a 2,5µm pela extensão de uma onda helicoidal e 0,4 a 0,6µm pelo diâmetro helicoidal. Para qualquer filamento estes valores são constantes por todo comprimento, sendo que a estrutura tem geometria conservada e pode ser observada como um cristal unidimensional (DePamphilis & Adler, 1971; Silverman & Simon, 1977; Macnab, 1987; Samatey, *et al.*, 2001).

A estrutura do filamento flagelar quando analisada em criomicroscopia eletrônica e reconstituição de imagens helicoidais mostra que o filamento é composto por um canal central, regiões externas, regiões distais de alta densidade (D0 e D1) que juntos formam uma estrutura tubular dupla, conectadas por intersecções radiais. A região externa também consiste em dois domínios: domínio D2, que tem a forma de uma coluna vertical; domínio D3, uma projeção que se estende além da coluna vertical (Yonekura *et al.*, 2002).

As subunidades de flagelina são capazes de se remontar *in vitro* para formar filamentos flagelares que mostram muitas das mesmas características da porção filamentosa da organela intacta. Porém, em condições fisiológicas adversas, as moléculas não se polimerizam. As regiões N- e C- terminais dos monômeros de flagelina são conhecidos por não se desdobrarem, o que previne a molécula de flagelina de interagir com outras moléculas para formar núcleos de polimerização. Em contraste, estas regiões bem dobradas no filamento, providenciam uma superfície apropriada para um segundo monômero de flagelina se ligar (Yonekura *et al.*, 2002).

O filamento flagelar é alongado pela adição de subunidades de flagelina no topo do filamento. Este processo foi observado *in vivo*, demonstrado em *Salmonella*, estudando a incorporação de aminoácidos análogos (Silverman & Simon, 1977).

Morfologicamente, os filamentos flagelares foram diferenciados por suas porções antigênicas e agrupados em seis morfotipos diferentes (A até F), observáveis em microscopia eletrônica de transmissão (Lawn *et al.*, 1977; Whitfield *et al.*, 1988; Seah & Kwang, 2000). O peso molecular das subunidades de flagelina variam entre 27 KDa a 69 KDa e está correlacionado com o diâmetro dos filamentos quando comparado com os diferentes morfotipos (Whitfield *et al.*, 1988).

A flagelina apresenta uma tendência muito grande em formar o filamento (Yonekura *et al.*, 2000; Yonekura *et al.*, 2002). Filamentos flagelares isolados podem ser rapidamente despolimerizados pelo calor, pH ácido ou outros tratamentos. O processo reverso de polimerização a filamentos ocorre espontaneamente sob adequadas condições, rendendo uma estrutura que é indistinguível da original. Normalmente esse processo requer a iniciação por um curto fragmento de “origem” do filamento. *In vitro* a razão do alongamento é constante, com monômeros sendo adicionados no topo distal do filamento (Silverman & Simon, 1977; Macnab, 1987).

É conhecida e consistente a idéia de que os filamentos de flagelina diferem entre si com uma pequena distância entre as subunidades. E ainda, dependendo do pH e da concentração de íons do meio onde a bactéria se encontra, a forma helicoidal do arranjo das subunidades de flagelina pode variar, portanto, o filamento flagelar dispõe de polimorfismo. Sendo assim, a variabilidade do antígeno H está associada à seqüência de aminoácidos da flagelina e seu gene estrutural (*fliC*), pois as porções distais são conservadas (Nanba *et al.*, 1989) e a região média apresenta variações o que caracteriza a especificidade do antígeno H.

Baseado no mapeamento protéico da flagelina, concluiu-se que as porções amino e carboxil terminal são altamente conservadas o que é essencial para a polimerização e secreção das moléculas de flagelina (Seah & Kwang, 2000), e que a região central pode divergir sem interferir no processo de montagem e que cada divergência pode ser responsável pela variação antigênica (Silverman & Simon, 1977; Macnab, 1987).

Mutações no gene responsável pela expressão da proteína flagelina (*fliC*) podem resultar em novas proteínas. Schoenhals & Whitfield (1993) demonstraram que estas mutações podem interferir na geração de diferentes proteínas, sendo que a flagelina H1 e H12 diferiam em apenas dois aminoácidos, demonstrando que a diferença nas regiões variáveis da molécula de flagelina pode afetar a morfologia do filamento, sendo esta a superfície exposta do filamento intacto.

Também tem sido proposto que a grande diversidade de antígenos H pode ser menos dependente do acúmulo de mutações na região variável e que os novos sorotipos derivam da transferência gênica lateral e recombinação do DNA do gene *fliC*, responsável pela expressão da proteína flagelina (Smith & Selander, 1990). Uma simples mutação pontual na sequência do gene *fliC* pode potencialmente resultar na geração de novos antígenos H e este mecanismo pode ter contribuído na origem dos diferentes antígenos H bacterianos que diferem em poucos aminoácidos (Joys & Schodel, 1991; Selander *et al*, 1992; Schoenhals & Whitfields, 1993).

Estudos em *Salmonella enterica* sugerem duas hipóteses: a primeira é que a região central do gene submeteu-se a uma “evolução não compelida” através da rápida fixação de mutações neutras pela deriva genética. A segunda hipótese é consideravelmente suportada pela evidência que a transferência gênica lateral e a recombinação de DNA são as principais fontes de variação para se criar novos genes *fliC* (Reid *et al*, 1999). Em outros casos, o papel da seleção natural pode ser problemático, já que, em certas partes da molécula, a seleção pode operar como uma força conservadora contra a mudança de aminoácidos, enquanto que em outras partes o processo de

seleção pode também ser uma força promotora de diversidade gerando polimorfismo e rapidez na evolução (Reid *et al.*, 1999).

## **6. Genes envolvidos na síntese flagelar**

Para a síntese do flagelo e do sistema de quimiotaxia é necessária a expressão de mais de 50 genes, organizados em 17 operons. Um elaborado sistema de regulação é acionado dependendo do ambiente onde o micro-organismo se encontra para montagem e expressão do flagelo (Soutourina & Bertin, 2003).

Em *E. coli* a biossíntese do flagelo é inibida por repressão catabólica na presença de D-glucose, altas temperaturas ou altas concentrações de sal, presença de carboidratos e de alcoóis de baixa massa molecular, pH extremos e ainda, na presença de inibidores de DNA girase (Soutourina & Bertin, 2003). O mecanismo molecular de repressão catabólica que controla a biossíntese do flagelo foi completamente descrito. Este fenômeno é observado na presença de D-glucose, quando a concentração do AMP cíclico (AMPc) na célula está baixo e CAP está presente essencialmente na forma incapaz de ativar a transcrição de genes específicos sem o AMPc ligante (Soutourina & Bertin, 2003). Experimentos demonstraram que o complexo AMPc-CAP controla positivamente a biossíntese do flagelo por ativação da transcrição do operon *flhDC*.

Fatores adicionais podem estar envolvidos na regulação da expressão dos genes flagelares. Por exemplo, proteínas componentes do sistema regulador OmpP estão envolvidos no controle da motilidade bacteriana dependentes de temperatura e osmolaridade (Soutourina & Bertin, 2003). Neste aspecto, duas proteínas QseBC, componentes do sistema *quorum sensing*, um mecanismo complexo de comunicação e sinalização célula-célula, regulam a motilidade bacteriana ativando a transcrição do operon *flhDC* (Diggle *et al.*, 2002; Soutourina & Bertin, 2003).

Se a bactéria é estimulada positivamente para expressão de genes flagelares, um complexo maquinário gênico é ativado em um regulon. Neste regulon, os operons estão divididos em três classes: inicial, intermediária e tardia, que são descritas respectivamente como classe I, classe II e classe III. Na fase inicial, estão incluídos genes que codificam proteínas estruturais, na intermediária genes reguladores para a montagem do corpo basal, gancho e motor. Já na fase tardia, são expressos genes que codificam proteínas estruturais do filamento flagelar (flagelina) e proteínas do sistema de transporte (secreção tipo III) (Soutourina & Bertin, 2003).

Genes de classe I estão incluídos no operon *flhDC*. As proteínas FlhC e FlhD formam um complexo heteromultimérico que direciona a transcrição dos promotores de classe II e alguns genes de classe III. O operon *flhDC* está no topo da hierarquia gênica e codifica um fator transcricional FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> que ativa a segunda classe de genes de expressão (Soutourina & Bertin, 2003). A proteína FlhD tem ampla função regulatória, porém sozinha ela não é capaz de se ligar ao DNA e promover a transcrição. Claret e Hughes (2002) afirmam que a proteína FlhC e não a FlhD é o componente responsável pela ligação do complexo FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub>. Esta afirmação está baseada no fato de que, diferentemente de FlhD, FlhC sozinha é capaz de se ligar ao DNA, porém com menor afinidade do que quando associada à FlhD. Os autores sugerem ainda que FlhC e FlhD em contato com o DNA contribuem para a estabilidade e especificidade na interação.

Muitos dos genes para a montagem do gancho e das estruturas do corpo-basal são encontrados na região I (*flgB*, *flgC*, *flgF*, *flgG*, *flgH*, *flgI*, *flgE*, *flgK*, *flgL*). Também há outros genes como *flgD*, que controlam a montagem da junção gancho-filamento, o gene *flgA* que permite a montagem de um dos anéis externos do corpo basal, o gene *flgM* que regula a expressão de genes de classe III até que a montagem do corpo basal-gancho esteja completa. Portanto, a região I é dedicada aos componentes da estrutura flagelar externa próxima da célula (Silverman & Simon, 1977; Macnab, 1992).

O operon de classe II são encontrados genes que codificam proteínas estruturais de montagem necessárias para biossíntese do motor flagelar e estruturas intermediárias, como corpo basal e gancho, além de genes *flgM* e *fliA*, que codificam proteínas regulatórias, como o fator  $\delta^{28}$ . Os genes *motA* e *motB* expressam proteínas envolvidas na quimiotaxia bacteriana, além dos genes *cheA*, *cheB*, *cheR*, *cheW*, *cheY*, *cheZ*. O fator  $\delta^{28}$ , codificado pelo gene *fliA* é necessário para promover a transcrição dos genes de classe III e genes tardios (Chilcott & Hughes, 2000). Um grande número de genes tardios, incluindo *flgK*, *flgL*, *flgM*, *flgN*, *fliD*, *fliS* e *fliT*, são expressos tanto em operon classe II como de classe III (Chilcott & Hughes, 2000).

Já o operon classe III (dividido em classe IIIa e classe IIIb) possui genes que codificam proteínas para finalização de montagem do gancho e corpo basal, bem como o filamento flagelar (Chilcott & Hughes, 2000).

Uma vez formado o gancho e o corpo basal, a proteína FlgM se liga a fator  $\delta^{28}$  e a transcrição dos genes de classe III ocorre. Já os genes *fliC* e *fliB*, responsáveis pela produção da flagelina e polimerização, respectivamente, fazem parte apenas do operon de classe III (Chilcott & Hughes, 2000). A região responsável pela montagem do filamento propriamente dito foi designada, portanto, de classe IIIa (*fliC* e *fliA*), bem como genes tardios que codificam proteínas acessórias do filamento (*fliD*, *fliS* e *fliT*) (Macnab, 1992). Na classe IIIb, estão organizados os genes iniciais *fliF*, *fliE*, *fliG*, *fliM*, *fliN*, *fliH*, *fliK* e *fliI*. Suas funções são compor proteínas dos anéis e corpo basal, bem como a montagem do aparato de secreção flagelar (Macnab, 1992).

## **7. Montagem do flagelo**

A montagem do flagelo é iniciado quando FliF, uma proteína componente do anel MS é incorporada na membrana citoplasmática bacteriana. Este processo é dependente do mecanismo de exportação Sec. O anel MS é o ponto de início para quaisquer outras estruturas flagelares que

serão montadas (Apel & Surette, 2008). Uma vez FliF incorporada à célula, FliG se liga à face citoplasmática do anel MS e depois juntam-se FliM e FliN, necessárias para compor a estrutura de ligação da membrana, apresentando também a função de auxílio na rotação flagelar (Apel & Surette, 2008).

O anel C é a única estrutura que fica completamente confinada no citoplasma. Compreende a principal zona de organização do complexo flagelar bacteriano, é composto de inúmeras proteínas e sua principal função é a rotação flagelar. FliG é o componente da região superior do anel C, e o conecta ao anel MS, interagindo fortemente com a proteína FliF. Outros componentes de membrana essenciais são as proteínas Mot. Experimentos indicam que o complexo protéico MotA e MotB deve ser formado logo após a montagem do anel C e ocorre provavelmente por difusão simples. O complexo protéico está intimamente ligado à função de rotação flagelar e fica inserido na membrana citoplasmática bacteriana, se associando posteriormente a proteínas componentes do motor flagelar (Macnab, 2003).

Todas as subestruturas, com exceção do anel P e L, são montadas através do sistema de secreção de proteínas do tipo III. As características do sistema de secreção do tipo III são as seguintes: a) têm função primordial na motilidade e funcionamento do flagelo além de secreção de proteínas, pois com apenas duas exceções (FliK e anti fator-sigma FlgM) as proteínas exportadas são incorporadas à estrutura; b) existe um canal central contínuo onde as estruturas flagelares são secretadas; c) subunidades protéicas são adicionadas até a parte distal do flagelo através deste canal. O sistema secretório fica alocado em junção com a membrana, no centro do anel MS (Macnab, 2003). Para a formação do sistema de secreção são necessárias as proteínas FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ, FliR, FliH, FliI, FliJ e FlgJ (Macnab, 2003; Apel & Surette, 2008).

A primeira subestrutura a ser secretada pelo sistema do tipo III é a proteína FliE, um componente do corpo basal. Ela é necessária para a secreção e exportação das demais proteínas e

fica alocada na face distal do anel MS. Em seguida, são secretadas proteínas para a formação da haste do corpo basal: FlgB, FlgC, FlgF, FlgG e FlgJ, sendo FlgJ a responsável por dar afinidade de interação entre as proteínas. FliE e FlgB têm grande afinidade, sendo que as proteínas FlgC, FlgF e FlgG ligam em seguida. FlgJ tem ainda a função de muraminidase, digerindo a porção de peptidoglicano da parede celular bacteriana onde a haste do flagelo será inserida (Homma *et al.*, 1990; Macnab, 2003; Apel & Surette, 2008).

Os anéis L e P são compostos respectivamente pelas lipoproteínas FlgI e FlgH, que são secretadas antes da formação do anel MS, sendo necessária a presença das proteínas da haste para o ponto de montagem e da presença de uma chaperona, FlgA, para direcionamento do local de montagem (Homma *et al.*, 1990; Macnab, 2003).

O próximo passo é o deslocamento da proteína FlgD para dar início a montagem do gancho, composto por FlgE. As proteínas FliK e FlhB estão intimamente ligadas à formação do gancho, pois controlam o tamanho correto do gancho para então dar início à fusão gancho-filamento. Quando o gancho apresenta o comprimento correto, inicia-se a formação das junções gancho-filamento, formadas pelas proteínas FlgK e FlgL, que permanecem no local, enquanto que FliD, uma proteína com as funções de capa da haste e capa do gancho, assumirá agora a função de capa do filamento, protegendo e direcionando assim, os monômeros de flagelina adicionados (Macnab, 2003).

A última etapa, não menos importante, é a montagem do filamento. Um único filamento pode contar com até 20.000 subunidades de flagelina (FliC). Diferentemente do gancho, não há mecanismo de regulação do tamanho do filamento, não havendo tal necessidade. O filamento pode romper, porém, há o processo regenerativo, pois é mantido um canal contínuo de exportação de proteínas e novas subunidades de flagelina são secretadas e inseridas, onde a proteína de capa (FliD) é imediatamente recolocada após a ruptura (Macnab, 2003).

## 8. Variação de fase

O flagelo bacteriano é um dos principais antígenos nas bactérias gram-negativas e a variedade sorológica do flagelo é importante na diferenciação bacteriana. Pois a flagelina determina a especificidade do antígeno flagelar (Ewing, 1986). A variação de fase de expressão antigênica é uma estratégia relativamente comum de muitas espécies bacterianas para adaptação a um determinado ambiente. A variação de fase de antígenos flagelares foi primeiramente descrito em *Salmonella entérica* sorotipo *typhimurium*.

A maioria dos sorotipos de *Salmonella* possui um sistema de locomoção composto por flagelos peritríquios. Uma característica deste gênero bacteriano é a presença de duas flagelinas diferentes codificadas pelos genes *fliC* e pelo operon *fljBA*, na maioria dos sorotipos, onde dois genes flagelares diferentes- *fliC* e *fljB*- são alternadamente expressos, gerando duas fases de antígenos H diferentes (Iino, 1969). O mecanismo molecular para variação de fase nestas bactérias é muito bem descrito (Zieg & Simon, 1980; Macnab, 1992). Estes genes estão localizados em regiões distantes do cromossomo e sua expressão alternada é controlada. *Salmonella* apresenta duas fases diferentes de expressão flagelar, fase 1 e fase 2 (Zieg *et al.*, 1977). Este controle é feito por um sítio específico de inversão de um segmento de DNA de aproximadamente 997 bases denominado segmento H. Este segmento contém um promotor para a transcrição dos genes *fljB* (que codifica flagelina) e *fljA* (gene repressor de *fliC*). Quando o promotor está em orientação positiva “on”, a proteína FljA reprime a expressão do gene *fliC* e permite apenas a expressão da flagelina FljB ou flagelo de fase 2. Para inversão da fase flagelar, um gene *hin* que codifica uma recombinase (Hin invertase) e uma seqüência de 26 bases de repetição (*hix*) são responsáveis por ativar uma recombinação invertida do segmento H. Quando isso acontece, a orientação genética é negativa (“off”), o operon *fljBA* é inativado e *fliC* é expresso, chamada de fase 1 (Zieg & Simon, 1980).

Existem pequenas divergências evolutivas entre *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorotipo *typhimurium*, onde a diferença principal entre elas é o sistema de secreção flagelar. Em *E. coli* K-12 apenas uma flagelina é codificada pelo gene *fliC48* (que codifica o antígeno flagelar 48), enquanto que em *S. enterica*, os genes *fliC* e *fljBA* expressam variação de fase (Zieg *et al.*, 1977). Esta hipótese foi aceita até meados dos anos 1980, onde a comunidade científica acreditava que amostras de *Escherichia coli* continham apenas um único gene *fliC* para expressão da proteína flagelina em seu cromossomo, sendo considerados portanto, flagelos monofásicos, ou seja, *E. coli* consideradas móveis manifestavam apenas um tipo de flagelo com atividade antigênica específica (Ratiner, 1982). Contudo, em 1982 e confirmado em 1983, Ratiner detectou que amostras de *E. coli* que expressavam antígeno flagelar H3 e H17 podiam, espontaneamente, mudar seus antígenos flagelares para H16 e H4, respectivamente (Ratiner, 1982; 1983).

Um total de 53 tipos diferentes de antígenos H em *E. coli* são oficialmente reconhecidos. Em 44 amostras de *E. coli* H padrão, a flagelina é codificada pelo gene *fliC*. Estudos posteriores dos genes flagelares em *E. coli* isoladas do ambiente demonstraram que algumas *E. coli* padrão para antígenos H apresentam outro gene para expressão de flagelina além de *fliC* (Ratiner, 1982; 1998). Quatro novos genes que expressam flagelina, nomeados *fliA* são responsáveis pela expressão dos antígenos H44 e H55 (Tominaga & Kutsukake, 2007), *flkA* que expressa os antígenos H3, H36, H47 e H53 (Tominaga, 2004), *flmA* responsável pela expressão do antígeno H54 (Tominaga, 2004) e *fliA*, que codifica o antígeno H17 (Ratiner *et al.*, 2010). A amostra H35 padrão contém um gene *fliC* interrompido e o gene responsável pela expressão do antígeno foi determinado mais tarde como *flkA* por Feng *et al.* (2008). As amostras padrão H3, H53 e H54 que além da expressão de flagelina por outro gene, apresentam ainda um gene que demonstra atividade repressora semelhante à proteína FljA de *Salmonella*, reprimindo a expressão de *fliC*, denominado *fljA* (Ratiner, 1998; Tominaga, 2004).

Segundo Tominaga (2004) os loci *flm* e *flk* são flanqueados por elementos de inserção e tais genes envolvidos em recombinação do DNA, sugerindo que estes genes podem ter sido transferidos como parte de unidades transponíveis, onde rearranjos podem ter acontecido (Tominaga, 2004; Tominaga & Kutsukake, 2007).

A ocorrência de variação de fase flagelar unilateral foi demonstrada em amostra de *E. coli* H3 padrão que alternavam a fase flagelar e expressavam o antígeno H16 (Ratiner, 1983). Determinadas condições de cultivo e mudanças de temperatura de incubação podem ser fatores cruciais na indução da variação de fase flagelar. Ratiner (1999) demonstrou que em uma população de *E. coli* podem existir linhagens que alteram sua especificidade ao antígeno flagelar de acordo com a temperatura de crescimento. Nas amostras investigadas, dois genes que codificam flagelina foram encontrados: um alelo de *fliC<sub>40</sub>* sensível à repressão de fase, porém expresso em amostras cultivadas a 37°C mas não a 30°C, e um alelo de *flkA<sub>53</sub>*, expresso em ambas as temperaturas. Desta forma, dois antígenos flagelares (H40 e H53) foram simultaneamente expressos a 37°C. Como *fliC<sub>40</sub>* foi sensível à repressão de fase e sua expressão dependente de temperatura isto pode refletir na sensibilidade à temperatura do gene repressor dentro da região de *flkA<sub>53</sub>*.

A região *flk* contém o gene que codifica flagelina (*flkA*), o gene repressor de *fliC* (*fljA* ou *flkB*) está localizado entre os genes cromossomais *rnpB* e *yhaC* nas amostras de *E. coli* padrão H3 e H53. Ratiner (1998) demonstrou que as *E. coli* padrão H3 e H47 apresentavam genes funcionais e que na variação de fase flagelar nestas amostras eram expressas como  $fliC^{off} + flkA^{on} \rightarrow fliC^{on} + flkA^{off}$ . Mais tarde, Feng *et al.* (2008) verificaram que o antígeno H35 também é expresso por *flkA* e que as regiões cromossomais *rnpB* e *yhaC* contém uma possível integrase, indicando que essa região do cromossomo é uma típica ilha genômica (GI). Deste modo, amostras que adquirirem tal GI, podem apresentar variação de fase.

## 9. Sorologia e técnicas moleculares para determinação dos antígenos H em *E. coli*

O antígeno “O” é um polissacarídeo termoestável que compõe o lipopolissacarídeo presente na membrana externa das bactérias gram-negativas. A denominação do antígeno K faz referência originalmente aos polissacarídeos capsulares que envolvem a parede celular (Ørskov & Ørskov, 1984). Os antígenos flagelares H de natureza protéica (flagelina), são termo-lábeis, são inativados pelo aquecimento a 100°C/30 minutos. Nem todos os isolados de *E. coli* apresentam todos os antígenos ao mesmo tempo. Algumas *E. coli* não apresentam o antígeno O, sendo consideradas rugosas, outras não possuem o antígeno K e outras ainda são imóveis e neste caso são designadas como de sorotipo imóvel (H-) ou não móvel (NM).

Atualmente são reconhecidos 53 antígenos H, numerados de 1 a 56, sendo que os números 13, 22 e 50 não são utilizados. O último antígeno incluído na lista, H56, foi descrito por Ørskov *et al.*(1975). A caracterização dos antígenos O e H em isolados de *E. coli* utilizando antissoros anti-O e anti-H é uma importante ferramenta epidemiológica, pois o sorotipo característico associado a fatores de virulência que a amostra pode carregar, nos permite enquadrar amostras potencialmente patogênicas em determinados sub-grupos de *E. coli* e assim relacioná-las à diferentes enteropatias (Ørskov *et al.*, 1975; Nataro & Kaper, 1998).

A sorotipagem é um método preciso e confiável para diferenciar amostras de *E. coli* e a identificação completa dos antígenos de um grupo de amostras exige a utilização de imunoreagentes específicos. De acordo com Scheutz *et al.* (2004), a sorologia é a ferramenta “*gold standard*” na tipagem de *E. coli* para estudos taxonômicos e epidemiológicos, um pré-requisito para qualquer ação no estudo de um surto e, até o momento, não pode ser substituído por outros métodos. Muitos sorotipos estão associados com enteropatias em humanos e todos os patotipos estão associados a animais: O2:H5,H6,H7,H29; O8:H2,H19,H21; O20:H19; O22:H8; O25:H2; O26:H11, HNT; O45:H2; O91:H10,H21; O103:H2; O105:H18; O111:H8;

O112ac:H19,H5; O113:H21; O118:H16; O119:H2,H6; O121:H19; O128:H2; O128ab:H2,H6; O145:H25,H28; O146:H21; O153:H25; O157:H7; O163:H19; O165:H25; O174:H2,H7,H21; ONT:H2,H8,H11,H25,H28,H33,H41, incluindo bovinos, suínos e caprinos (Blanco *et al.*, 2003; Hussein, 2007; Mattsson & Wallgren, 2008). Considerando estas associações, a determinação do antígeno O pode ser guiada pela identificação dos antígenos H entre amostras patogênicas. Isto é importante, pois a identificação de um antígeno H em particular poderia reduzir o tempo, custo e o número de antissoros necessários para identificar os antígenos O de *E. coli* (Blanco *et al.*, 1992; Moreno *et al.*, 2006).

A identificação dos antígenos H é relativamente custosa e consome tempo. Além disso, algumas bactérias *in vitro* não expressam o flagelo, dependendo de condições especiais e ainda, o número de amostras não tipáveis pela sorologia convencional não é baixo (Fields *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2000).

As regiões terminais 5' e 3' do gene *fliC* são altamente conservadas, sendo considerados bons alvos para reação em cadeia da polimerase (PCR). Estas regiões conservadas permitem a amplificação de uma variedade de alelos com um único iniciador (Fields *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2000). Em 1997, Fields *et al.* demonstraram que a PCR associada à análise dos fragmentos de restrição de genes polimórficos (PCR-RFLP) podia ser utilizada para identificação destes antígenos. Os autores mostraram que a análise dos fragmentos de restrição do gene *fliC* pode ser usada para distinguir STEC O157:H7 de O157:H-. Mais tarde, Machado *et al.* (2000), utilizando outros iniciadores e enzimas de restrição, mostraram a possibilidade de se compor um banco de dados para análise de PCR-RFLP para todas as amostras padrão de antígenos H. Estes métodos são importantes para determinar as relações genéticas entre as amostras e estudos epidemiológicos complementares à sorologia convencional (Fields *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2006). Entretanto, alguns genes *fliC* não podem ser caracterizados por PCR-

RFLP. Para caracterizar estes genes alguns autores utilizam técnicas de sequenciamento do gene *fliC*, com intuito de identificar possíveis novas flagelinas expressas pelo gene *fliC* (Machado *et al.*, 2000; Prager *et al.*, 2003; Tominaga *et al.*, 2004), sendo que quase todas as seqüências dos genes que codificam as diferentes flagelinas foram publicadas (Schoenhals & Whitfield, 1993; Wang *et al.*, 2003). Com base nestas informações, a restrição de genes flagelares amplificados de *E. coli* tem sido utilizada na identificação dos tipos de flagelos tanto em amostras que a expressam (móvel) como em aquelas com o fenótipo imóvel (Fields *et al.*, 1997; Gannon *et al.*, 1997).

Frente a estas considerações, este projeto teve por objetivo a caracterização dos antígenos flagelares de amostras de *E. coli* que apresentam fatores de virulência associados a diferentes enteropatias e que expressam o fenótipo motilidade, porém com antígeno H não tipáveis (HNT). As amostras apresentaram o perfil HNT por dois motivos: não reagiram com nenhum antissoro da coleção de antissoros padrão ou reagiram com mais de um antissoro. Diante destas informações, criamos duas hipóteses: as amostras poderiam apresentar um gene *fliC* novo ou apresentar mais de uma flagelina expressa simultaneamente?

Para tal, iniciamos o estudo do gene responsável pela flagelina, *fliC*, o qual foi amplificado por PCR e digerido por enzimas de restrição. Os fragmentos obtidos da digestão foram comparados àqueles obtidos da digestão dos amplicons obtidos das amostras padrão. As amostras que não apresentaram PCR-RFLP característico tiveram seu gene seqüenciado e antissoros produzidos. Os genes responsáveis pela expressão da flagelina durante a variação de fase (*flmA*, *flkA* e *fljA*) foram detectados através da técnica de PCR, verificado a expressão destas proteínas em amostras portadoras do gene através da indução da variação de fase e detecção do RNAm respectivo.

## **II) OBJETIVOS**

---

## II) Objetivos

Este trabalho teve como objetivo detectar, identificar e caracterizar novos antígenos flagelares, bem como detectar o fenômeno de variação de fase flagelar em 31 amostras de *Escherichia coli* HNT isoladas de diferentes animais e alimentos de origem animal.

### Objetivos Específicos

- Estabelecer o método da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene *fliC*, responsável pela proteína estrutural flagelina, tanto em cepas padrão para antígenos H, quanto em cepas de *E.coli* HNT utilizando os iniciadores propostos por Fields *et al.* (1997) e Machado *et al.* (2000);
- Obter os perfis de restrição com as enzimas de restrição *RsaI* e *HhaI* dos genes *fliC* obtido das cepas padrão para os antígenos H e das *E.coli* HNT respectivamente, pela técnica de PCR-RFLP;
- Comparar os padrões de restrição (PCR-RFLP) obtidos das cepas padrão de antígeno H com os perfis obtidos na PCR-RFLP das cepas HNT;
- Verificar a presença dos genes associados à variação de fase: *fljA*, *flkA* e *flmA*;
- Produzir antissoros em coelhos para cada antígeno HNT que não tenha sido possível caracterizar por ensaios moleculares;
- Utilizando técnicas sorológicas, comparar a especificidade do(s) antissoro(s) frente aos antígenos H padrão e aos antígenos das cepas HNT;
- Seqüenciar e comparar o amplicon do gene *fliC* e dos genes referentes à variação de fase flagelar amplificados obtidos das cepas HNT com aqueles já descritos;
- Detectar pela RT-PCR a expressão dos genes de variação de fase.

## **III) MATERIAL E MÉTODOS**

---

### III) Material e Métodos

#### 1. Amostras de *Escherichia coli*

##### 1.1. Amostras padrão para o antígeno flagelar “H”

Foram utilizadas 53 amostras de *Escherichia coli* padrão para os antígenos H (Quadro 1) provenientes do Laboratório de Antígenos Bacterianos II, do Departamento de Genética e Evolução e Bioagentes, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). As amostras H13, H22 e H50 foram excluídas da lista por não se tratarem de antígenos H padrões característicos.

**Quadro 1- Amostras de *Escherichia coli* padrão para antígeno flagelar (H).**

O6: <b>H1</b>	O9: <b>H12</b>	O86: <b>H25</b>	O86: <b>H36</b>	O156: <b>H47</b>
O3: <b>H2</b>	O18: <b>H14</b>	O38: <b>H26</b>	O42: <b>H37</b>	O16: <b>H48</b>
O53: <b>H3</b>	O23: <b>H15</b>	O58: <b>H27</b>	O69: <b>H38</b>	O6: <b>H49</b>
O50: <b>H4</b>	O46: <b>H16</b>	O148: <b>H28</b>	O110: <b>H39</b>	O8: <b>H51</b>
O4: <b>H5</b>	O15: <b>H17</b>	O138: <b>H29</b>	O41: <b>H40</b>	O11: <b>H52</b>
O120: <b>H6</b>	O17: <b>H18</b>	O86: <b>H30</b>	O137: <b>H41</b>	O148: <b>H53</b>
O1: <b>H7</b>	O32: <b>H19</b>	O73: <b>H31</b>	O70: <b>H42</b>	O161: <b>H54</b>
O105: <b>H8</b>	O126: <b>H20</b>	O114: <b>H32</b>	O140: <b>H43</b>	O4: <b>H55</b>
O30: <b>H9</b>	O146: <b>H21</b>	O60: <b>H33</b>	O3: <b>H44</b>	O139: <b>H56</b>
O108: <b>H10</b>	O158: <b>H23</b>	O160: <b>H34</b>	O125: <b>H45</b>	H13, H22 e H50 foram removidos.
O26: <b>H11</b>	O51: <b>H24</b>	O134: <b>H35</b>	O115: <b>H46</b>	

##### 1.2. Amostras de campo H não - tipável (HNT)

Foram utilizadas trinta e uma amostras de *E.coli*, isoladas de diferentes animais e alimentos, que apresentavam fatores de virulência ligados à enteropatias. As amostras foram isoladas de diferentes regiões da Espanha e não apresentam correlação entre elas. As amostras foram

gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Jorge Blanco, Diretor do Laboratório de Referência de *Escherichia coli*, da Faculdade de Veterinária da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha. As amostras foram inicialmente sorotipadas utilizando o conjunto completo de anti-soros anti-H (53 soros) do *Statens Serum Institut*, Copenhague, Dinamarca (Quadro 2) e todas apresentaram fenótipo HNT (H-não tipável).

**Quadro 2 - Amostras de *E. coli* com antígeno H não tipável (HNT)**

<b>Amostras</b>	<b>Código</b>	<b>Sorogrupo</b>	<b>Origem</b>	<b>Fatores de virulência</b>
1C	FV955b	O20	Bovino	VT1; <i>eae</i>
2C	FV955b.2	O20	Bovino	-
3C	FV4755	O8	Bovino	VT1; Ehly; saa
4C	FV2418	O8	Bovino	-
5C	FV2757	O123	Bovino	-
6C	FV2836	O141	Bovino	VT1; VT2; Ehly
7C	FV2836.2	O141	Bovino	-
8C	FV2546.3	O159	Bovino	-
12C	VTO 5	O42	Ovino	VT1
13C	VTO 5.2	O42	Ovino	-
14C	VTO 5.3	O42	Ovino	-
15C	VTO218-71	O75	Ovino	VT1; Ehly
16C	VTO656-227.1	O128	Ovino	VT1; VT2
17C	VTO656-227.2	O128	Ovino	-
18C	VTO325-121	ONT	Ovino	VT1; VT2; Ehly
19C	VTO536-198	ONT	Ovino	VT1; Ehly
20C	FV4726	O8	Suíno	LT; STb; K88
21C	FV4502.1	O11	Suíno	-
22C	FV4502.2	O11	Suíno	-
26C	FV4384.1	O157	Suíno	-
27C	FV4384.2	O157	Suíno	-
29C	FV3501b	ONT	Suíno	-
32C	FV4701.2	ONT	Suíno	-
33C	FV4289	O9	Leite	VT1; Ehly
34C	FV3713	O91	Leite	VT1; VT2; Ehly
35C	FV3713.2	O91	Leite	-
36C	FV4230	ONT	Leite	VT1; VT2; Ehly
37C	FV1808	O76	Caprino	VT1
38C	FV1808.2	O76	Caprino	-
39C	VTF 40C	ONT	Carne	VT2; Ehly
40C	FV4020	O121	Ave	-

\* VT1: Verotoxina tipo 1; VT2: Verotoxina tipo 2; Ehly: Enterohemolisina; *eae*: gene *eae*; saa: proteína aglutinante de *E. coli* Enterohemorrágica; K88: fimbria K88; LT: Toxina termo-lábil; STb: toxina termo-estável tipo B.

## 2. Extração de DNA de *E.coli*

Amostras de *E. coli* padrão e de campo foram semeadas em dois ml de caldo Luria-Bertani (LB) e incubadas a 37°C por 18/24 horas. DNAs genômicos foram extraídos utilizando Kit “Wizard® Genomic DNA Purification System” (Promega/EUA) e seguindo as especificações do fabricante. O DNA foi quantificado através do Espectrofotômetro Genequant II (GE /EUA) com leitura de densidade ótica a 260-280 nm. O DNA bacteriano foi armazenado a -20°C em água ultra-pura estéril até o momento do uso. O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel a 0,7% de agarose para avaliação da sua integridade. O gel foi submerso em solução de brometo de etídio (1,5µg/mL) por 15 minutos. O DNA corado foi visualizado em transiluminador de luz Ultra-violeta (UV) (GE/EUA).

## 3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

### 3.1. PCR do gene *fliC* de amostras de *E.coli*

Para amplificar o gene *fliC* de *E. coli* utilizamos dois pares de iniciadores: FliC(F) e FliC(M) (Fields *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2000) (Quadro 3). Para as reações foram acrescentados “PCR Buffer 1X (Fermentas); 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTP (Fermentas); 1,5 U de Taq-DNA Polimerase (Fermentas); 20 pmol de cada iniciador; 50 ng de DNA bacteriano previamente extraído e água ultra-pura q.s.p. 50 µL em um tubo de 0,2 ml.

As soluções foram pré-aquecidas a 94°C/5' seguindo-se de 30 ciclos de: 94°C/1' temperatura de anelamento variável entre 50°C-60°C/1', temperatura de extensão de 72°C/2' e, em seguida, a 72°C/7' para extensão final, utilizando termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems/EUA). Como controle positivo das reações, utilizamos a *E. coli* DH5α (*fliC*<sub>H48</sub>).

### Quadro 3. Iniciadores utilizados para detecção do gene *fliC* de *E. coli*.

Iniciador	Sequência 5´- 3´	Tamanho do Produto (PB)	Referência Bibliográfica
<b>FliC(F)</b>	F: ATGGCACAAGTCATTAATACCCAAC R: CTAACCCTGCAGCAGAGACA	Variável	Fields <i>et al.</i> , (1997).
<b>FliC(M)</b>	F: CAAGTCATTAATAC(A/C)AACAGCC R: GACAT(A/G)TT(A/G)GA(G/A/C)ACTTC(G/C)GT	Variável	Machado <i>et al.</i> , (2000).

#### 3.2. Iniciadores utilizados para o estudo da variação de fase:

Os genes responsáveis pela de variação de fase em *E. coli* (*flkA* e *flmA*) e o gene *fljA*, responsável pela repressão do gene *fliC*, foram amplificados por PCR e seus pares de iniciadores foram construídos de acordo com a seqüência do gene depositada no Banco de dados GeneBank (NCBI database website) por Tominaga (2004). As informações obtidas descreviam a seqüência do operon, porém os iniciadores foram construídos para amplificar somente o gene responsável pela produção da flagelina (*flkA* e *flmA* das amostras H3, H53 e H54). Para o gene *fljA* geral, construímos um par de iniciador que reconhecesse gene *fljA* de todas as amostras padrão H3, H53 e H54. Os iniciadores foram denominados FljA, FlkA3, FlkA53 e FlmA54 (Quadro 4).

As seqüências gênicas depositadas no *GeneBank* com a numeração de referência AB128916, AB128917 e AB128918 (H3, H53 e H54 respectivamente) de Tominaga (2004) foram analisadas utilizando o sistema *Primer3 Imput* ([http://frodo.wi.mit.edu/cginn/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cginn/primer3/primer3_www.cgi); [http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) para a seleção dos iniciadores e posteriormente o sistema BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) foi utilizado para avaliar a especificidade dos iniciadores obtidos. A seqüência dos iniciadores e o tamanho dos fragmentos esperados estão descritos no Quadro 4.

#### Quadro 4: Iniciadores utilizados para detecção dos genes *fljA*, *flkA* e *flmA* de *E. coli*.

Gene alvo	Iniciadores	Seqüências 5' - 3'	Produto (pb)
<i>fljA</i>	FljAF FljAR	TGCATATGGTTGCCATTAGG AGGAAGCTCGTTCGTATCCT	423
<i>flkA3</i>	FlkA3F FlkA3R	TGGCTTAGCAGTTGTCATGC AGCAACCTCCAACAACAACACT	1072
<i>flkA53</i>	FlkA53F FlkA53R	GTCGCGTAGTCGGAGTCTTC AAGCAAGTCACGTGGAAGTC	933
<i>flmA54</i>	FlmA54F FlmA54R	TCGTAACGCCAATGATGGTA AGAAGACGAGCTTCGGCATA	1230

### 3.3. PCR para detecção dos genes de variação de fase flagelar de em *E. coli*

Para a amplificação dos genes *fljA*, *flkA* e *flmA* das amostras de *E. coli* de interesse, o DNA total das amostras foram extraídos conforme o item 2. As reações de PCR foram realizadas com base na metodologia descrita no item 3.1. A temperatura de anelamento dos iniciadores foi estabelecida utilizando o termociclador Mastercycler Gradient/ Eppendorf com gradiente de temperatura. Para os pares de iniciadores FljA, FlkA53 e FlmA54 a temperatura estabelecida foi de 55°C, onde todas as amostras controle (*E. coli* H3, H53 e H54) mostraram-se positivas e todos os produtos obtidos não apresentaram resultados com ampliações inespecíficas.

### 3.4. Eletroforese em gel de agarose

Após as reações de PCR, os produtos das reações foram aplicados em gel de agarose (Promega/USA) a 1,5% em tampão T.A.E. (Tris 2 M, Ácido acético 0,04 M, EDTA 0,01 M pH 8,0), acrescido de 2 µL de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol; 25% de ficoll). Como padrão de peso molecular utilizou-se Gene Ruller 1 kb (Fermentas/EUA).

Para visualização dos resultados, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (1,5 µg/mL) por 15 minutos e submetido ao transiluminador de luz UV (GE Health Care/EUA). Os resultados foram fotografados pelo sistema ImageMaster VDS (GE Health Care/ EUA) e os arquivos salvos na extensão Tiff.

#### **4. Digestão enzimática dos amplicons de *fliC* (PCR-RFLP)**

##### **4.1. Concentração dos produtos de PCR**

Os produtos obtidos pela PCR de FliC(F) e FliC(M) foram concentrados com etanol, segundo protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Para 100 µL de reação de PCR foram adicionados 4 µL de NaCl 5 M em eppendorf de 1,5 ml. Em seguida, foram adicionados 2,5 vezes o volume de etanol absoluto e a reação foi incubada a -20°C por 30 minutos. O material foi então centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. O precipitado obtido foi submetido a lavagens consecutivas utilizando etanol 70% à -20°C. O precipitado contendo o produto de PCR concentrado foi ressuspenso em 20 µL de água ultra-pura estéril e armazenado a -20°C até o momento de uso.

##### **4.2. Reações de digestão enzimática para verificação do Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP)**

Para os ensaios de digestão enzimática do gene *fliC* (RFLP) foram utilizadas duas enzimas de restrição: *HhaI* (Fermentas) para os produtos obtidos com o iniciador FliC(M) e *RsaI* (Invitrogen) para os produtos obtidos com o iniciador FliC(F).

A enzima *RsaI* foi selecionada por Fields *et al.* (1997) considerando o resultado do sequenciamento de cinco alelos de *fliC*, uma vez que gerava uma variedade de tamanhos de bandas, gerando resultados discriminatórios que diferenciava os antígenos H. Os iniciadores propostos por Machado *et al.* (2000) são degenerados e após testes preliminares, a enzima *HhaI*, foi escolhida uma vez que os tamanhos dos fragmentos observados eram similares àqueles calculados com os mapas de restrição das seqüências de DNA das flagelinas H1, H7 e H12.

O DNA foi digerido pela enzima de restrição *HhaI* a 60°C por 3 horas e *RsaI* por a 37°C/18hs, de acordo com o fabricante. Para a inativação das enzimas *HhaI* e *RsaI* o material foi colocado em banho-maria por 20 minutos a 80°C e 65°C por 10 minutos, respectivamente.

Em seguida, o produto da digestão foi separado por eletroforese em gel de Metaphor agarose 2% (Cambrex Bio Science/EUA) acrescido de tampão (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol; 25% de ficoll) durante 3 horas a 70 volts. Em seguida, submerso em solução de brometo de etídio (1,5 µg/mL) por 20 minutos. Padrões de peso molecular de 50 pb (Invitrogen); 100 pb (Fermentas) e de 1 kb (Fermentas, Gibco). Foram utilizados como padrão de tamanho molecular de fragmentos internos e externos e as imagens obtidas foram digitalizadas e arquivadas.

#### **4.3. Análise dos resultados da RFLP**

Os resultados das reações de PCR-RFLP das amostras H padrão e posteriormente das amostras com fenótipo HNT, tiveram o peso molecular das bandas amplificadas, calculados e analisados pelo software ImageMaster TotalLab versão 2.01 (GE Health Care/EUA) e posteriormente pelo programa Gel Compar® (Applied Maths, versão 4.5/Bélgica) para o estabelecimento dos diferentes perfis das amostras padrão e de campo. Dois fragmentos foram considerados idênticos quando seus tamanhos não diferiram mais que 3,5%, quando utilizado padrão de peso molecular interno. Com o peso molecular externo, há uma tolerância de 10%, devido ao erro associado com os fragmentos menores (Fields et al., 1997; Machado et al., 2000).

## **5. Sequenciamento**

### **5.1. Sequenciamento pela técnica de *cromossomo walking* :**

Os produtos de PCR de cada amostra de *E.coli* HNT foram purificados utilizando a enzima *ExoSAP-IT* (Promega/EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Para cada 5 µl de produto da PCR, foi adicionado 1 µl da enzima *ExoSAP-IT* (Promega/EUA) e a solução foi incubada a 37°C por 15 minutos e depois a 80°C para a inativação enzimática. Os produtos purificados foram estocados a -20°C.

Para o sequenciamento foram utilizados: 1 µl do produto da PCR purificado e 1µl do iniciador, em placa de 96 poços. Foram adicionados 4µl do pré-mix do kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (GE Health Care) para um volume total de reação de 10 µl. As condições da reação foram de 30 ciclos (95°C/20seg, 50°C/15seg, 60°C 1min). Em seguida, o material foi precipitado conforme orientações instruções do fabricante. O material foi seqüenciado utilizando MegaBASE™ 1000 (Amersham Bioscience). O tempo e a voltagem da injeção das amostras foram de 60 s e 750 V, respectivamente. Cada corrida foi realizada a 44 °C. Os resultados foram obtidos utilizando os programas Phred/ Phrap/ Consed para montagem dos *contings* (<http://www.washington.edu>).

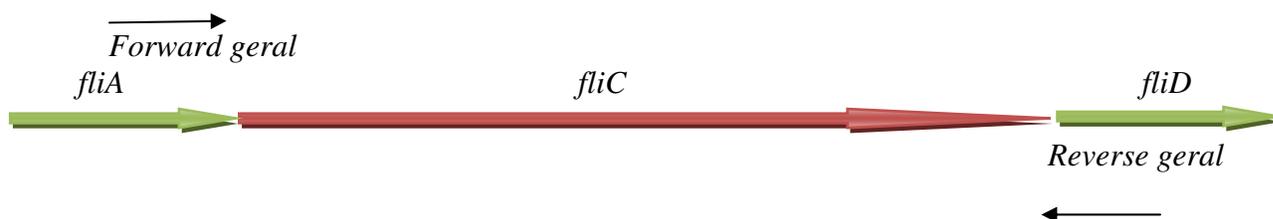
Os resultados do sequenciamento foram interpretados utilizando o programa Chromas Lite 4.0 e Software MEGA versão 4.1 para montagem das seqüências e análises dos eletroferogramas. O sistema BLAST foi também utilizado como ferramenta de análise de similaridade entre as sequencias.

## **5.2. Construção dos iniciadores externos para os genes *fljA*, *flkA*, *flmA* e *fliC* de *E.coli*.**

Para as reações iniciais de sequenciamento, foram utilizados os mesmos pares de iniciadores descritos nos itens 3.1., para o gene *fliC*, e 3.2. para os genes *fljA*, *flkA* e *flmA*.

Para a construção dos iniciadores externos para os genes *fljA* e *flmA* para as amostrass H35, 3C e 4C e do gene *fliC*, para as amostras 3C, 4C, 29C, 33C e 40C, foram utilizadas as seqüências de nucleotídeos depositadas no GeneBank que apresentaram maior porcentagem de similaridade às seqüências obtidas por nós. A região de anelamento corresponde aos genes que flanqueiam *fljA* e *flmA* com a finalidade de obter sequencias totais dos genes. Para o gene *fljA* utilizou-se a referência AM124020 de *Salmonella enterica* e para o gene *flmA* a referência AB128918 de *E. coli*. Os iniciadores seguem descritos no Quadro 5.

Para o gene *fliC* das amostras HNT utilizou-se as sequencias que apresentaram maior similaridade com as sequencias obtidas e, ainda, foram desenhados iniciadores baseados na sequencia de *fliA* e *fliD*, genes adjacentes à *fliC*, no intuito de se obter uma sequencia completa do gene, demonstrado na figura abaixo:



**Quadro 5 - Iniciadores dos genes de variação de fase em *Escherichia coli* utilizados no sequenciamento para amplificação das extremidades dos genes e montagem dos contigs.**

Gene	Amostra	Iniciadores	Seqüências 5' -> 3'	Produto (pb)
<i>fliA</i>	H35	J35AF	ACCTGTGGCGATTTCAGAAAC	VARIÁVEL
		J35AR	TGAGTTTCTCGCATCACTCG	
	3C e 4C	J35BF	GATTGCCATTGCCACTTAC	
		J35BR	ATTCCGACTACGCGACTGAA	
<i>fliC</i>	3C e 4C	J3C/4CAF	CAACAGGCGGGTACTCTGT	
		J3C4CAR	CGAGTGATGCGAGAAACTCA	
	4C	J3C/4CBF	GGGAAACAACGGCGTTAAT	
		J3C/4CR	CGGTGGAACGGATCAGTATT	
<i>fliA</i>	4C	M4CAF	AATATTCACGGGGCCATTTT	
		M4CAR	AATTTCCACAAGCCCTGATG	
	4C	M4CBF	CGTTGTTGAATTTCTCTTGAA	
		M4CBR	TCTTCGGAAGCTTGTGGAAC	
<i>fliC</i>		<i>Forward Geral (fliA)</i>	ACCAGGAAGAGCTGAATCTCAA	
		<i>Reverse Geral (fliD)</i>	AACGACGATTGCTGATTTGA	
	3C	F3CF	ATTACTATTAAACTGCAGGAAA	
		F3CR	CTGACCTGCTGCGTCATCTT	
	4C	F4CF	GCAAATAGTGAATTCAACAGCCTTA	
		F4CR	TTAAACGATAACGGAGACTGC	
	29C	F29CF	TTAACGGCGTTAGCAAACGTT	
		F29CR	ATCGATAGTTGCTAAAACAT	
33C	F33CF	TCAATTTTAGCCAGCGGG		
	F33CR	GACTACGCGACCGAAGT		
40C	F40CF	CTGCTGTGTTAGCCGCAGC		
	F40CR	CGGTCACCAACCTGAACAACA		

## **6. Preparação e obtenção do antígeno “H” das amostras HNT de *E.coli*:**

### **6.1. Obtenção dos antígenos H padrão e HNT (não tipáveis)**

As amostras de *E.coli* HNT foram semeadas em tubos U contendo o meio de cultura MILi (Toledo *et al*; 1982), incubadas por 24 horas a 37° C ou até que o crescimento alcançasse o lado oposto do tubo semeado. Foram realizadas cinco passagens consecutivas. Da quinta passagem, as amostras bacterianas foram repicadas para tubos contendo 7 ml de caldo BHI e incubadas a 37°C em estufa sob agitação por 6-8 horas. Em seguida, ao volume do tubo foi acrescentado de igual volume de solução fisiológica contendo 10% de formalina. Essa suspensão foi incubada por 18 horas em temperatura ambiente. A turbidez foi ajustada para o tubo 4 da escala de Mc Farland. As suspensões foram mantidas sob refrigeração até o momento de seu uso.

### **6.2. Obtenção de antissoros anti-HNT**

Para cada amostra de suspensão bacteriana de *E.coli* HNT foram utilizados pelo menos dois coelhos albinos adultos, de doze semanas de idade e aproximadamente 1,5 kg, para a obtenção de antissoros. Os coelhos foram inoculados na veia marginal da orelha com volumes de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 ml em intervalos de 4-5 dias (Ewing, 1986). De 6-8 dias após a última inoculação, os animais foram sangrados (sangria de prova) e os soros titulados. Uma vez determinado por altos títulos dos antissoros, os animais foram anestesiados (ketamina/xilazina 35-50/5-10mg/Kg) por via intramuscular e exsanguinados. Após a separação, os soros foram clarificados por centrifugação, aliquotados e mantidos -80°C.

## **7. Ensaio de sorologia em mostras HNT de *E.coli*:**

### **7.1. Determinação do título dos antissoros anti-HNT**

Para a determinação dos títulos dos antissoros anti-HNT foram realizados testes de aglutinação em tubos. Em baterias de tubos de vidro tipo Kahn foram adicionados 200 µL de

diferentes diluições (razão 2) dos antissoros a serem titulados (1:100 a 1:20.000). A estas diluições foram adicionados 200 µl das susoensões de HNT. A mistura foi incubada em banho-maria a 45°C por 3 horas. Além dos antígenos homólogos cada antissoro foi também testado frente a antígenos H padrão heterólogos.

Reação positiva foi aquela em que observou-se a formação de uma película no fundo do tubo e o sobrenadante manteve-se límpido, enquanto que na reação negativa o sobrenadante permaneceu turvo. O título do antissoro foi considerado como a maior diluição do antissoro capaz de reagir com a amostra homóloga fortemente. Os antissoros que reagiram positivamente contra algum antígeno heterólogo foram absorvidos para eliminar reações cruzadas.

## **7.2. Absorção de antissoros anti-HNT**

Para as reações de absorção, igual volume de suspensão de antígeno H obtido no item 6.1. foi adicionado igual volume de antissoro diluído a 1:50 em eppendorf estéril. A mistura foi mantida em banho-maria a 50°C por 1 hora e então centrifugada. O sobrenadante foi então adicionado um segundo volume da suspensão de antígeno H, incubado por 1 hora em banho-maria a 50°C e então centrifugado (Ewing, 1986). O antissoro absorvido foi titulado usando testes de diluição em tubos como descrito no item 7.1., iniciando-se em 1:100.

## **8. Reação de variação de fase; fase reversão**

As amostras de *E.coli* H padrão e HNT que mostraram resultado positivo na PCR para os genes de variação de fase foram cultivadas em tubos U contendo meio semi-sólido. Foram realizadas três passagens de cada amostra em meio sem adição de antissoro e posteriormente mais três passagens em meio contendo antissoro (1:3.000) para induzir a variação da fase flagelar. Após o procedimento, as amostras foram repicadas em tubos contendo 7 ml de caldo BHI e incubadas a 37° C em estufa com agitação por 6-8 horas, até atingir a turbidez compatível

à escala 4 de MacFarland. Em seguida foi acrescentado igual volume de salina fisiológica contendo 1,0% de formalina e as suspensões foram mantidas à temperatura ambiente por 18 horas.

A determinação do antígeno H expresso pelas amostras HNT foi realizada a técnica de aglutinação em tubo com todos os antissoros (H1 até H56) em diluições crescentes (razão de 1:10 a 1:10000), em seguida foi adicionado igual volume de antígeno H. A reação foi incubada em banho-maria a 45° C por 3 horas e a leitura realizada ao final do período.

## **9. RT-PCR**

### **9.1. Detecção de RNAm dos genes de expressão de variação de fase flagelar**

As amostras 3C e 4C, variação de fase negativa e positiva respectivamente, foram utilizadas para a detecção de RNAm dos genes *fliC*, *fljA* e *flmA*. Para tal, as amostras foram cultivadas com meios de cultura semi-sólido acrescido de antissoros (diluição final 1:3000). Os antissoros acrescidos aos meios de cultura foram anti-H48, anti-H54, anti-H4C e anti-H3C, em diferentes combinações (item 8), a fim de induzir a variação de fase. Ao fim de sucessivas passagens em tubos U, as amostras foram inoculadas em caldo BHI acrescido de antissoros e incubadas a 37°C sob agitação. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 rpm, descartado o sobrenadante e o material foi utilizado para extração do RNAt.

### **9.2. Extração do RNA total**

Às amostras obtidas no item anterior foram adicionados 700 µL de *TRIzol*® resfriado a 4°C. A mistura foi mantida a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foram acrescentados 140 µL de clorofórmio gelado às amostras, homogeneizadas em vórtex e mantidas à temperatura ambiente por 3 min. Após, foram centrifugadas por 15 min a 12.000 x g a 4°C. Recuperou-se o sobrenadante (~ 500 µL) e foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado, sendo os mesmos

mantidos em temperatura ambiente por 10 min. Concluído este período as amostras foram centrifugadas a 12.000 g / 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 700 µL de etanol 75% (v/v) gelado. Em seguida, os microtubos foram centrifugados em a 12.000 g /5min. O sobrenadante foi eliminado, deixando-se o precipitado secar em temperatura ambiente e, posteriormente, adicionou-se de 30 µL de água ultrapura. Após a extração do RNA, deu-se o tratamento com DNase para purificação do RNA. Foram adicionados a 17 µL de RNA total, 2 µL de DNase Buffer, 0,5 µL de DNase (Invitrogen) e 0,5 µL de RNase OUT (Invitrogen). A solução foi incubada a 42°C/ 15min e em seguida foram adicionados 0,5 µL de STOP solution (EDTA) e a reação foi incubada a 65°C/5min.

### **9.3. Síntese de cDNA**

A reação de síntese de cDNA constituiu, para todas as amostras, de: 1 µl de RNA total, 9,6 µL de água e 5 pmol de iniciador oligo dT. A mistura foi mantida por 10 min a 70°C e 5 min no gelo. Posteriormente, foram acrescentados 4 µL de tampão 5x da transcriptase reversa M-MLV (ClonTech), 10 mM de DTT, 2,5 mM de cada dNTP e 200 unidades de transcriptase reversa M-MLV (ClonTech). A mistura foi incubada a 42 °C por 2 hs a enzima foi denaturada à 70 °C por 15 min.

### **9.4. Reação de RT-PCR**

Para a reação de RT-PCR foi utilizado o cDNA preparado com iniciadores construídos para *fljA*, *fliC* e *flmA*, não ultrapassando 130pb (Quadro 6). Para os iniciadores a temperatura de anelamento foi 68°C. Dez microlitros do produto da PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% que foi visualizado utilizando solução de brometo de etídio (1,5 µg/ml) e transiluminador de luz UV (GE Health Care/EUA). As imagens foram registradas no sistema ImageMaster VDS (GE Health Care/ EUA).

**Quadro 6. Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR para detecção do RNAm dos genes *fliC* e de variação de fase.**

<b>Nome</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>Tamanho produto (pb)</b>
16SrRNA_F2	TCA AGT CAT CAT GGC CCT TAC GAC	119
16SrRNA_R2	GGA CTA CGA CGC ACT TTA TGA GGT C	
flic_F1(4C)	ATC TGC GCA CGA GAC ATG TTA GAC	121
flic_R1(4C)	GGC AAC ACC GTA AAC AAC CTG TC	
flic_F2(H48)	CAG AGT TAG TAC CGT TAG TTG CCT G	120
flic_R2(H48)	CGT AAC GCG AAT GAT GGT ATT TCT G	
fljA_F1	ACT ATC CAG TGA AGT TGG TAA GCA G	115
fljA_R1	CGA TTG CAT CCC TTA GCC TCA TCA G	
flma4c_F1	ATG GTA TTT CTG TTG CTC AGA CCA C	123
flma4c_R1	GTT AGT AGC TTG AAC TGT AAG CTC AC	

## **IV) RESULTADOS**

---

## IV) Resultados

### 1. Perfil sorológico das amostras de *Escherichia coli* HNT (não tipável)

As amostras foram testadas sorologicamente a fim de confirmar o sorotipo não característico ou não tipável (HNT). A maioria das amostras não apresentou reação com nenhum antissoro H padrão ou apresentaram reação cruzada com mais de um antissoro. Os resultados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1: Perfil sorológico das amostras de *E. coli* isoladas de animais e alimentos que apresentam perfil HNT (não tipável).**

Amostra	Código	Ag O	Ag H	Amostra	Código	Ag O	Ag H
1C	FV955b	O20	NR*	20C	FV4726	O8	NR
2C	FV955b.2	O20	NR	21C	FV4502.1	O11	NR
3C	FV4755	O8	NR	22C	FV4502.2	O11	NR
4C	FV2418	O8	H48/ H54	26C	FV4384.1	O157	NR
5C	FV2757	O123	NR	27C	FV4384.2	O157	H33/H53
6C	FV2836	O141	NR	29C	FV3501b	ONT	NR
7C	FV2836.2	O141	NR	32C	FV4701.2	ONT	NR
8C	FV2546.3	O159	NR	33C	FV4289	O9	NR
12C	VTO 5	O42	NR	34C	FV3713	O91	NR
13C	VTO 5.2	O42	H38/ H51	35C	FV3713.2	O91	NR
14C	VTO 5.3	O42	H37/ H48/ H38	36C	FV4230	ONT	NR
15C	VTO218-71	O75	H3/ H8	37C	FV1808	O76	NR
16C	VTO656-227.1	O128	NR	38C	FV1808.2	O76	NR
17C	VTO656-227.2	O128	H38/H48	39C	VTF 40C	ONT	H3/H8
18C	VTO325-121	ONT	NR	40C	FV4020	O121	NR
19C	VTO536-198	ONT	NR				

\* NR: Não houve reação positiva com nenhum antissoro.

### 2. PCR

#### 2.1. PCR do gene *fliC* de amostras de *E. coli* padrão de antígeno H

Cinquenta e três amostras de *E.coli* padrão para o gene *fliC* foram submetidas à reação de PCR para amplificação do gene utilizando iniciadores propostos por Fields *et al.* (1997) e Machado *et al.* (2000). O gene *fliC* de 51 amostras de *E.coli* padrão para antígenos H foi

amplificado pelo iniciador FliC(M) e do mesmo modo, 49 das amostras padrão tiveram seu gene amplificado pelo iniciador FliC(F). Os resultados das amplificações estão demonstrados na Tabela 2.

O gene *fliC* das amostras padrão H17 e H25 não foram amplificadas utilizando os iniciadores propostos por Fields *et al.* (1997). As amostras de *E.coli* padrões H53 e H54 não amplificaram com os iniciadores propostos por Machado *et al.* (2000) e Fields *et al.* (1997). As amostras com antígeno H padrão, resultaram em produtos de PCR que variaram em tamanho molecular (amplicons) de 925pb a 2635pb utilizando o par de iniciador FliC(M), e de 1080 a 2850 pb com o par de iniciador FliC(F).

**Tabela 2: Tamanho dos produtos da PCR utilizando os iniciadores FliC(M) e FliC(F) para o gene para antígenos H de amostras de *E.coli* padrão.**

Antígeno H	FliC(M) (pb)	FliC(F) (pb)	Antígeno H	FliC(M) (pb)	FliC(F) (pb)
H1	1400	1260	H30	1800	1730
H2	1650	1450	H31	1255	1250
H3	1540	1500	H32	1760	1690
H4	980	1180	H33	1150	1290
H5	1345	1290	H34	1650	1665
H6	1280	1300	H35	1420	1425
H7	1290	1260	H36	2635	2850
H8	1520	1480	H37	1770	1650
H9	2030	1970	H38	1170	1375
H10	1250	1260	H39	1300	1225
H11	1545	1450	H40	1595	1530
H12	1705	1745	H41	1770	1670
H14	1280	2035	H42	1245	1290
H15	1730	1630	H43	1575	1510
H16	1590	1610	H44	925	1080
H17	950	-*	H45	1750	1730
H18	1260	1630	H46	1800	1710
H19	1245	1250	H47	1540	1510
H20	1870	1800	H48	1565	1470
H21	1325	1300	H49	1640	1680
H23	1200	1330	H51	1770	1790
H24	1800	1750	H52	1200	1350
H25	1280	-	H53	-	-
H26	1820	1635	H54	-	-
H27	1330	1230	H55	1250	1300
H28	1250	1195	H56	1290	1300
H29	1355	1240			

\* -: não houve reação positiva.

## 2.2. PCR das amostras de *E. coli* com perfil de antígeno HNT (não tipável)

Trinta e uma amostras de *E. coli* HNT foram testadas em reações de PCR para amplificação do gene *fliC* utilizando os iniciadores *FliC(F)* e *FliC(M)*.

O tamanho dos produtos amplificados das amostras HNT estão descritas na Tabela 3. Assim como algumas amostras padrão, onde não foi possível obter resultado positivo na PCR utilizando *FliC(F)*, em duas amostras HNT não foi possível estabelecer uma reação satisfatória com esse iniciador e não amplificaram o gene. Cinco amostras não apresentaram produto amplificado utilizando *FliC(M)*. Os produtos encontrados nas reações de PCR utilizando *FliC (M)* com as amostras HNT variaram em tamanho molecular entre 960 a 1700pb, enquanto que para os iniciadores *FliC(F)* a variação foi entre 1280 a 1800pb.

**Tabela 3 - Tamanho do produto da PCR para o gene H de amostras de *E.coli* HNT utilizando os iniciadores *FliC(M)* e *FliC(F)*.**

Amostras	<i>fliC(M)</i> (pb)	<i>fliC(F)</i> (pb)	Amostras	<i>fliC(M)</i> (pb)	<i>fliC(F)</i> (pb)
(1C) FV 955b	-*	1580	(20C) FV 4726	1670	1790
(2C) FV 955b.2	1670	1565	(21C) FV 4502	1630/540	1790
(3C) FV 4755	-	1480	(22C) FV 4502.2	1705	1700
(4C) FV 2418	1560	1455	(26C) FV 4384	-	1280
(5C) FV 2757	-	1655	(27C) FV 4384.2	1130	1265
(6C) FV 2836	1730	1665	(29C) FV 3501b	1510	1650
(7C) FV 2836.2	1500	1650	(32C) FV 4701.2	1650	1700
(8C) FV 2546	1625	1610	(33C) FV 4289	1370	1460
(12C) VTO 5	1280	1335	(34C) FV 3713	960	-
(13C) VTO 5.2	1380	1290	(35C) FV 3713.2	1000	-
(14C) VTO 5.3	1380	1295	(36C) FV 4230	1400	1445
(15C)VTO 218-71	1435	1425	(37C) FV 1808	1400	1520
(16C) VTO 656-227	1400	1435	(38C) FV 1808.2	1400	1455
(17C) VTO 656-227.2	1435	1450	(39C) VTF 40C	1480	1450
(18C) VTO 325-121	1400	1430	(40C) FV 4020	1560	1690
(19C) VTO 536-198	-	1510			

\* -: não houve reação positiva.

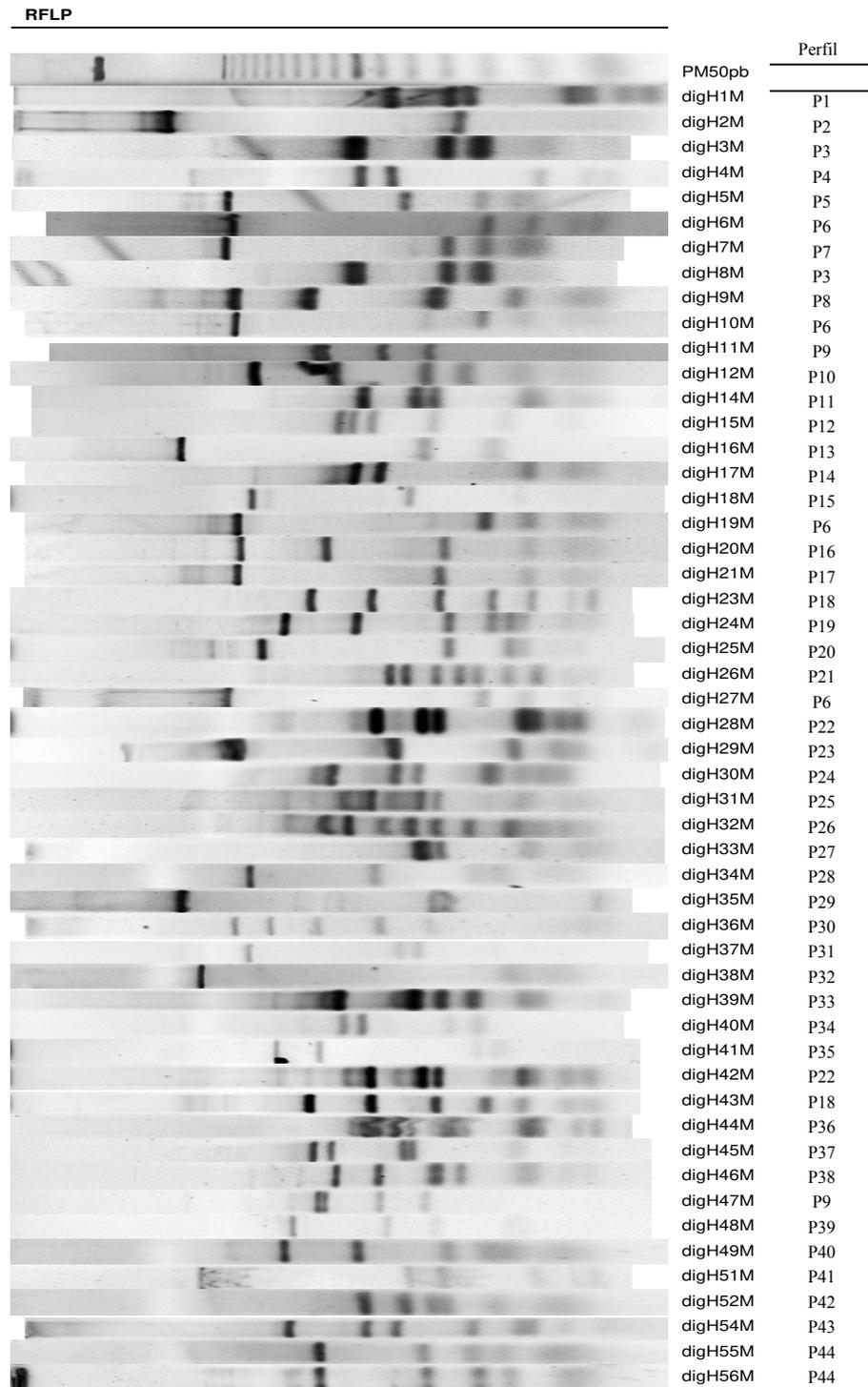
### 3. RFLP

#### 3.1. Detecção de polimorfismo e perfis de restrição do gene *fliC* de *E. coli* padrão e *E. coli* HNT

Para o experimento de comparação dos perfis apresentados na RFLP, utilizando a enzima *HhaI* para os produtos gênicos gerados pelo iniciador *FliC(M)*, e a enzima *RsaI* para os produtos gerados utilizando o iniciador *FliC(F)*, o programa Gel compar II® foi utilizado como ferramenta de análise de polimorfismo e para montagem de banco de dados. Tal procedimento foi realizado tomando como base que fragmentos gerados com tamanhos diferentes em até 3,5% foram considerados idênticos.

Os produtos gerados utilizando o iniciador *FliC(M)* e a enzima de restrição *HhaI* discriminaram a maioria das amostras padrão de *E. coli* estudadas para o antígeno H. As amostras padrão para o antígeno H3 e H8; H6, H10, H19 e H27; H11 e H47; H23 e H43; H28 e H42; H55 e H56 apresentaram o mesmo perfil de restrição (Figura B; Tabela 4), sendo, portanto, classificadas dentro do mesmo grupo.

Com relação aos produtos de digestão enzimática utilizando a enzima *RsaI* e o iniciador *FliC(F)*, verificamos que as amostras padrão para os antígenos H3 e H8 apresentaram o mesmo perfil de digestão, pertencendo, portanto, ao mesmo grupo antigênico. As amostras H1, H28 e H31 também apresentaram o mesmo perfil de digestão, bem como as amostras H2, H30 e H35 e ainda H9 e H14; H11 e H47; H7, H19 e H27; H55 e H56. Ainda neste contexto, as amostras padrão H5 e H21 podem também ser consideradas de mesma classe, pois apresentaram o mesmo perfil de digestão. Esses resultados estão na Figura C; Tabela 4.



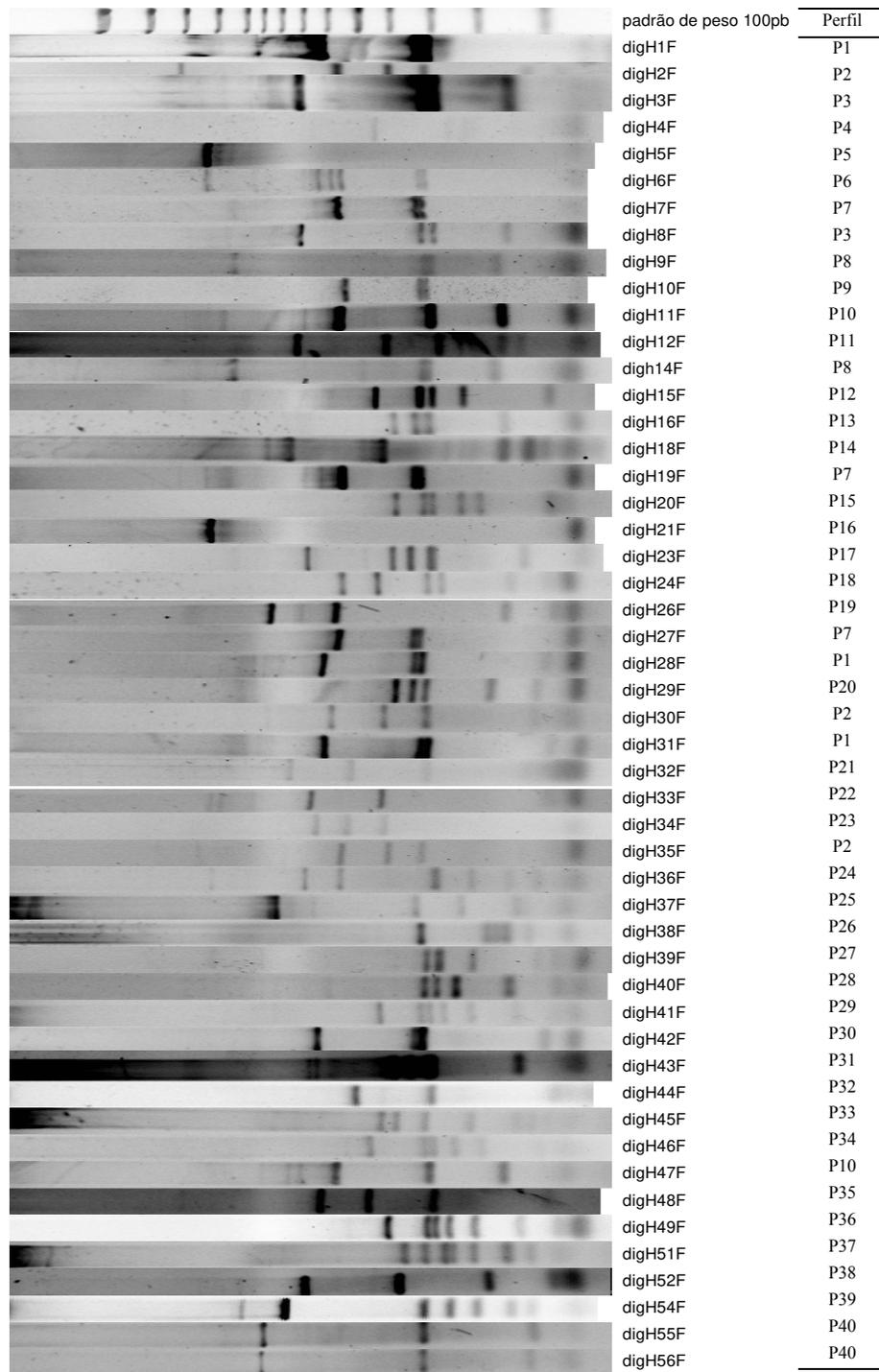
**Figura B.** Perfis eletroforéticos dos amplificados obtidos com os iniciadores FliC(M) com a enzima *HhaI*, nas amostras de *E. coli* H padrão, gerado pelo programa GELCOMPAR II. PM50pb – padrão de peso molecular de 50 pb; dig – digerido.

**Tabela 4: Resultados do polimorfismo da PCR-RFLP, utilizando os iniciadores FliC(F) e FliC(M) para o gene *fliC* de *Escherichia coli* H padrão.**

Antígeno H	PCR-RFLP ( <i>RsaI</i> ) em bp	Perfil	PCR-RFLP ( <i>HhaI</i> ) em bp	Perfil
H1	630, 330, 310	P1	285, 195, 170, 70	P1
H2	570, 410, 320, 120	P2	1370, 180	P2
H3	720, 320, 290, 150	P3	360, 350, 150, 110	P3
H4	440, 255, 230	P4	340, 285, 100, 60, 50	P4
H5	1290	P5	770, 260, 160, 120	P5
H6	565, 335, 320	P6	750, 150, 110, 70, 50	P6
H7	570, 340, 330	P7	790, 200, 150, 120, 105	P7
H8	710, 330, 295, 150	P3	360, 350, 150, 110	P3
H9	1115, 315, 170	P8	735, 470, 215, 120, 70	P8
H10	540, 320, 310	P9	740, 160, 115, 70, 50	P6
H11	560, 300, 160	P10	445, 435, 300, 220	P9
H12	730, 410, 280, 160, 130	P11	655, 410, 230, 175, 120	P10
H14	1115, 315, 170	P8	340, 245, 220, 110, 105, 60	P11
H15	440, 325, 300, 230, 95	P12	390, 360, 320, 215, 130	P12
H16	390, 330, 300, 150	P13	1220, 230, 140	P13
H17	-	- <sup>a</sup>	355, 305, 110, 70	P14
H18	760, 420, 150, 120, 95	P14	660, 250	P15
H19	550, 335, 325	P7	750, 150, 110, 70, 50	P6
H20	385, 315, 300, 230, 200	P15	710, 420, 200, 110, 60	P16
H21	1275	P16	720, 210, 110, 70, 55	P17
H23	680, 390, 350, 300, 130	P17	460, 320, 210, 145, 105, 70	P18
H24	550, 440, 310, 275, 140	P18	540, 340, 195, 145, 135	P19
H25	-	-	625, 195, 130, 125	P20
H26	860, 570, 150	P19	290, 260, 210, 180, 160, 130, 100	P21
H27	560, 340, 330	P7	740, 155, 110, 70, 50	P6
H28	620, 335, 320	P1	315, 235, 210, 110, 100, 80, 70	P22
H29	380, 340, 310, 175, 110	P20	740, 280, 125, 80, 70	P23
H30	590, 420, 310, 120	P2	410, 280, 240, 150, 115, 100, 85	P24
H31	610, 320, 310	P1	380, 320, 285, 240, 215, 115, 65	P25
H32	760, 525, 305	P21	430, 370, 300, 250, 210, 170, 130, 80	P26
H33	670, 420	P22	235, 230, 210, 105	P27
H34	640, 535, 415	P23	670, 315, 160, 135	P28
H35	570, 410, 310, 120	P2	1210, 220, 195	P29
H36	690, 560, 290, 210, 150, 105	P24	740, 595, 445, 305, 220	P30
H37	840, 330, 230, 130	P25	680, 270, 240	P31
H38	320, 180, 165, 150, 120	P26	995, 130	P32
H39	310, 280, 270, 210, 110, 90	P27	390, 250, 210, 170, 110, 105	P33
H40	315, 290, 250, 145, 85	P28	380, 340, 195, 160	P34
H41	430, 320, 300, 270, 215, 130	P29	570, 440, 160, 130	P35
H42	640, 320, 310, 95	P30	320, 235, 210, 115, 70, 60	P22
H43	390, 350, 300, 290, 130	P31	465, 320, 215, 150, 115, 75	P18
H44	710, 610, 500, 300, 90	P32	335, 315, 275, 250, 190, 110, 70	P36
H45	430, 380, 315, 215, 140, 130, 110	P33	455, 410, 260, 250, 115	P37
H46	460, 315, 300, 250, 200, 105	P34	400, 310, 215, 180, 110, 80	P38
H47	575, 300, 155	P10	445, 430, 300, 230	P9
H48	630, 470, 290, 95	P35	515, 290, 210, 125, 100	P39
H49	410, 310, 290, 260, 210, 130, 70	P36	540, 350, 200, 150, 130	P40
H51	360, 310, 270, 210, 150, 115	P37	1000, 250, 205, 105	P41
H52	695, 375, 180, 90	P38	335, 260, 220, 140	P42
H53	-	-	-	-
H54	780, 315, 255, 200, 145, 115	P39	525, 330, 275, 165, 115, 110	P43
H55	900, 305, 105	P40	440, 235, 165, 130, 80, 60	P44
H56	900, 305, 105	P40	440, 230, 160, 125, 80, 60	P44

a: não houve reação positiva nos ensaios de PCR-RFLP

RFLPfields



**Figura C-** Perfis eletroforéticos da RFLP obtidos com os iniciadores FliC(F) com a enzima *RsaI*, nas amostras de *E. coli* H padrão, gerado pelo programa GELCOMPARE II. PM100pb - padrão de peso molecular de 100 pb; dig – digerido.

Nos experimentos realizados com as amostras de *E.coli* HNT os *amplicons* foram tratados com a enzima de restrição *HhaI* e os resultados obtidos nesta digestão enzimática estão na Figura D. São apresentadas duas imagens em razão dos marcadores de peso molecular utilizados, sendo a imagem superior para o padrão de 50pb e a imagem inferior padrão para o marcador de 100 pb. Os tamanhos dos produtos da digestão com *HhaI* estão na Tabela 5.

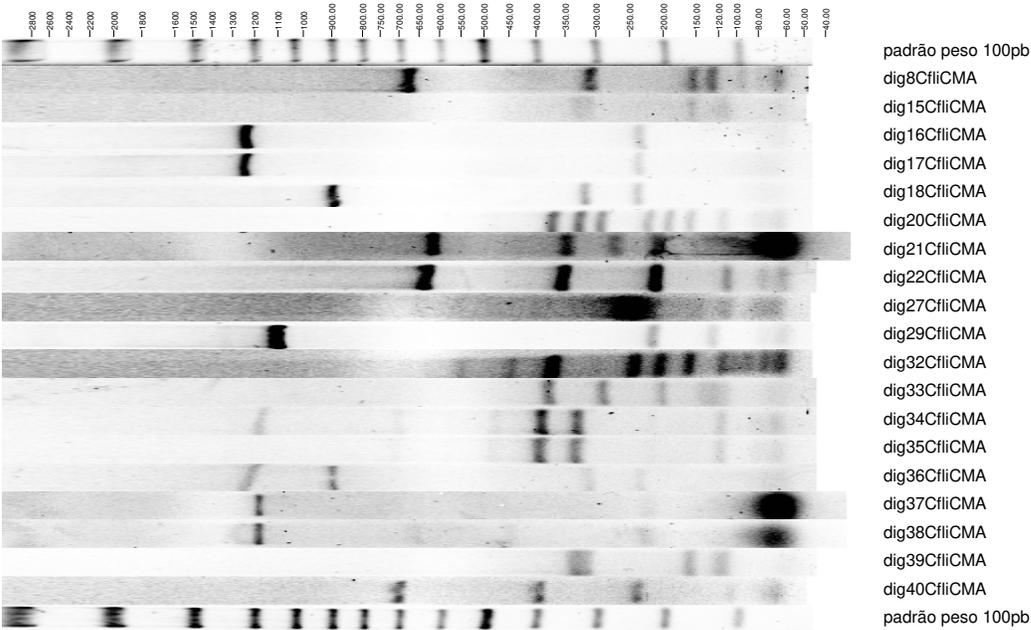
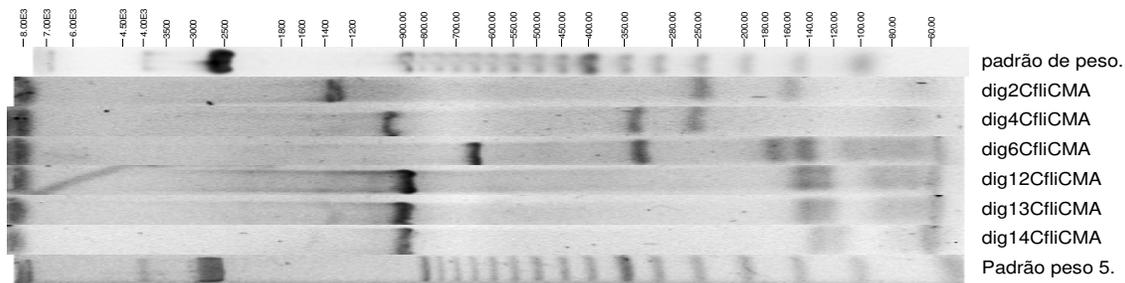
Para os ensaios de digestão enzimática dos produtos amplificados com os iniciadores *FliC(F)*, utilizou-se a endonuclease de restrição *RsaI*. Os produtos da digestão podem ser visualizados na Figura E e Tabela 6.

As amostras analisadas utilizando *RsaI* e *HhaI* geraram 33 perfis diferentes de RFLP, sendo que algumas amostras HNT apresentaram padrão de restrição semelhante às amostras H padrão.

**Tabela 5: Produtos amplificados com o iniciador *FliC(M)* e resultados da digestão enzimática utilizando a endonuclease de restrição *HhaI* em amostras de *E. coli* isoladas de animais e alimentos.**

Amostra	Fragmento de restrição (pb)	Perfil Molecular	Amostra	Fragmento de restrição (pb)	Perfil Molecular
1C	NR	-	20C	375/325/295/225/190/160/115	<b>P32</b>
2C	1290/245/160	Pi	21C	620/350/275/200	Px
3C	NR	-	22C	635/360/210/115	Px
4C	985/340/260	Pii	26C	NR	-
5C	NR	-	27C	255/230/118	Pxi
6C	650/330/175/145	<b>P23</b>	29C	1095/220/130	Pxii
7C	NR	-	32C	370/240/200/170/120/85	Pxiii
8C	675/310/160/130/95	Piii	33C	380/295/200	Pxiv
12C	875/145/130/60	Piv	34C	390/335/120	Pxiv
13C	900/140/130/60	Piv	35C	395/340/120	Pxv
14C	890/130/120	Pv	36C	905/315/240	Pxvi
15C	340/310/160/105/70	Pvi	37C	1190/235	Pxvii
16C	1235/240	Pvii	38C	1190/230	Pxvii
17C	1240/240	Pviii	39C	325/165/120	Pxviii
18C	900/320/240	Pix	40C	700/400/240/105	Pxix
19C	NR	-			

\* NR: não houve reação positiva.

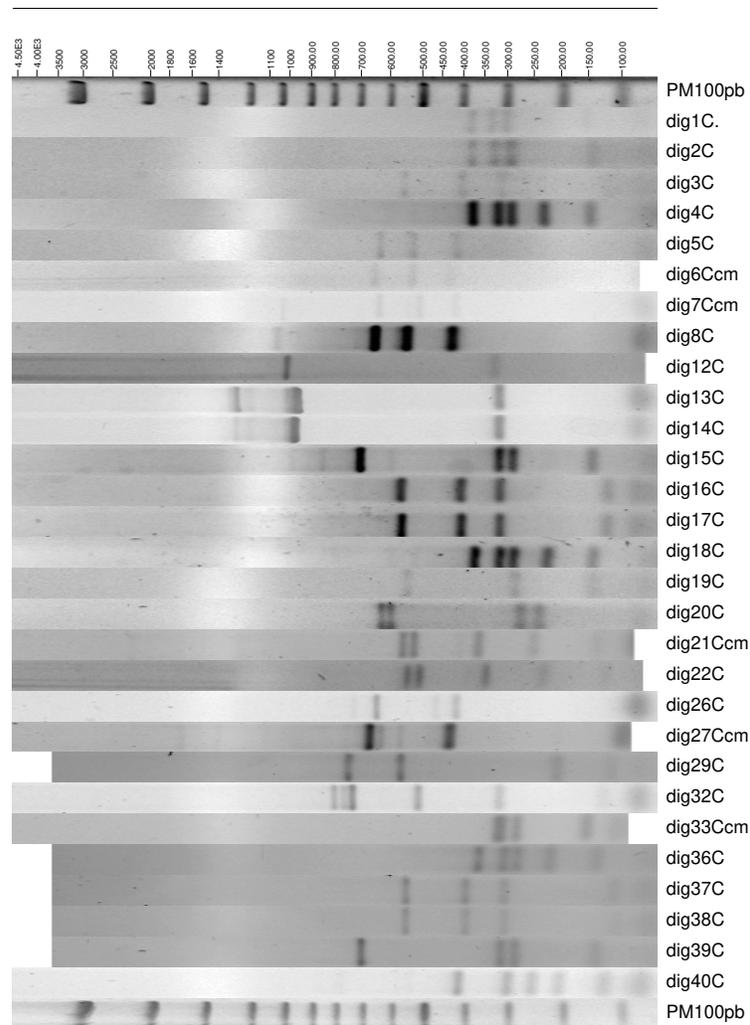


**Figura D:** Perfil eletroforético dos amplificados das amostras HNT analisados pelo programa Gel Compar II utilizando o iniciador FliC(M) e a endonuclease de restrição *HhaI*. Na imagem superior foi utilizado padrão de peso molecular de 50pb (Invitrogen) e na imagem inferior padrão de 100pb (Fermentas).

**Tabela 6: Produtos amplificados com iniciador FliC(F) e resultados da digestão enzimática utilizando a endonuclease de restrição *RsaI* em amostras de *E. coli* isoladas de animais e outras fontes.**

<b>Amostra</b>	<b>Fragmentos de Restrição (pb)</b>	<b>Perfil Molecular</b>	<b>Amostra</b>	<b>Fragmentos de Restrição (pb)</b>	<b>Perfil Molecular</b>
1C	380/335/305/150	<b>P13</b>	20C	635/605/275/245	Pxxvii
2C	385/330/290/145	<b>P13</b>	21C	565/530/365/255	Pxxvii
3C	550/410/315	Pxx	22C	550/515/355/235	Pxxvii
4C	385/320/295/235/150	Pxxi	26C	650/470/420	Pxxviii
5C	640/530/425	<b>P28</b>	27C	675/435	<b>P27</b>
6C	660/530/420	<b>P28</b>	29C	760/570/205/120	Pxxiv
7C	1005/640/515	Pxxii	32C	810/735/520/320	Pxxx
8C	650/555/430	<b>P28</b>	33C	310/270/150	Pxxxix
12C	1022/335	Pxxiii	34C	NR	-
13C	960/320	Pxxiii	35C	NR	-
14C	980/320	Pxxiii	36C	370/310/285/220/135	Pxxv
15C	700/320/290/150	Pxxiv	37C	555/400/300	Pxxxii
16C	570/410/320/120	<b>P2</b>	38C	555/395/310/125	Pxxxii
17C	570/410/320/125	<b>P2</b>	39C	705/320/390/135	Pxxiv
18C	375/320/300/230/145	Pxxv	40C	420/305/260/210/125	Pxxxiii
19C	570/305/160	Pxxvi			

\* NR: não houve reação positiva.



**Figura E:** Perfil eletroforético dos amplificadores de amostras HNT analisados pelo programa Gel Compar II utilizando o iniciador FliC(F) e a endonuclease de restrição *RsaI*. Utilizamos como padrão de peso molecular o marcador de 100pb (Fermentas). As amostras estão nomeadas como amostra a legenda à direita.

### 3.2. Análise do perfil de restrição das amostras de *E.coli* H padrão e amostras HNT

Nove amostras de *E. coli* HNT mostraram um perfil de digestão (RFLP) semelhante com aqueles das amostras padrão para antígenos H. Os resultados da digestão dos amplicons obtidos com os iniciadores FliC(M) e FliC(F) das amostras HNT foram comparados pelo programa Gel Compar II<sup>®</sup>. Na Tabela 7 estão discriminadas algumas amostras HNT que apresentaram perfis iguais a amostras H padrão em apenas um dos experimentos de PCR-RFLP. Assim, consideramos

os resultados indicados pelo programa Gel Compar II® como característicos do antígeno apresentado. Todas as amostras HNT com perfis semelhantes foram testadas.

A amostra de campo 6C apresentou após RFLP com os produtos dos dois conjuntos de iniciadores FliC(M) e FliC(F), perfis considerados idênticos pelo programa Gel Compar II à amostra padrão H34. Porém, nos ensaios sorológicos a amostra não reagiu com o soro anti-H34. As amostras 5C e 8C apresentaram o mesmo perfil de restrição da amostra padrão H34 utilizando PCR-RFLP descrito por Fields *et al.* (1997). Essas amostras foram todas consideradas, portanto, H34 (Tabela 7, Figura F e G).

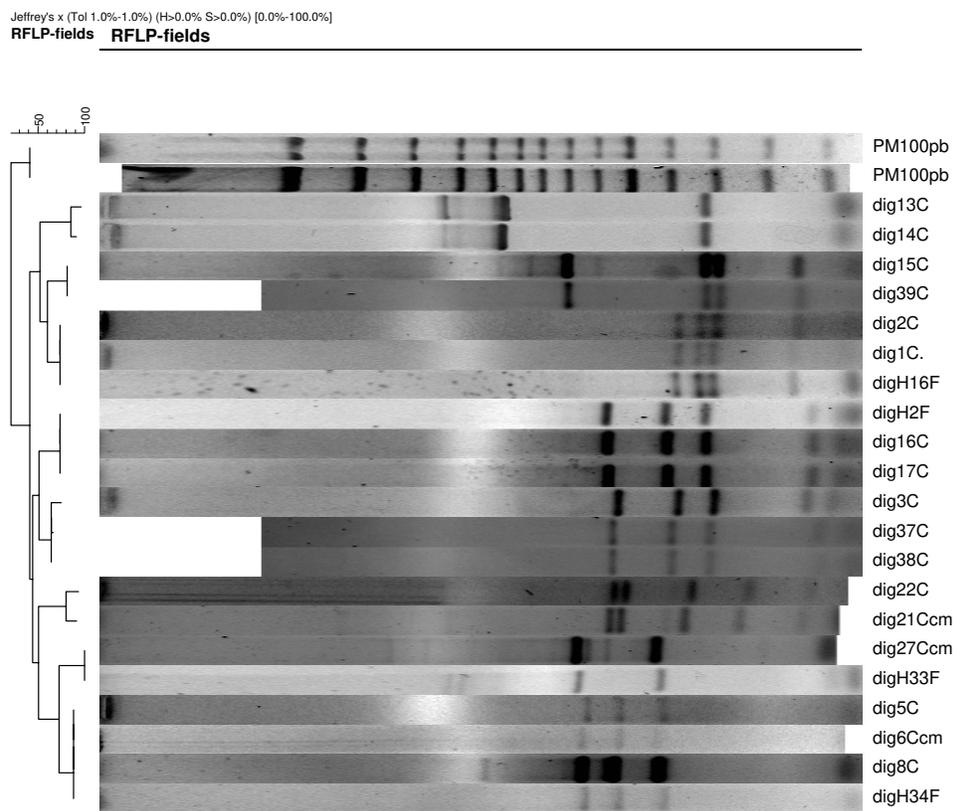
Os ensaios de RFLP das amostras 1C e 2C, originadas da amostra FV955b, apresentaram perfis semelhantes com o padrão H16 quando utilizado o iniciador FliC(F). Essas mesmas amostras não apresentaram PCR-RFLP semelhante com o iniciador FliC(M) e a enzima *HhaI*. A amostra 1C não apresentou perfil de digestão enquanto que a amostra 2C apresentou perfil distinto. As amostras 1C e 2C foram consideradas com perfil genotípico H16. (Tabela 7; Figura F e G).

Do mesmo modo as amostras 13C e 14C, originadas da amostra VTO 5, apresentaram perfis semelhantes entre si e aglutinaram na presença de antissoro anti-H38. Porém, ambas as amostras apresentaram sorologia positiva com outros antissoros anti-H e apresentaram PCR-RFLP distintos e foram consideradas como HNT (Tabela 7, Figura F e G).

As amostras 16C e 17C originadas da amostra VTO656-227 apresentaram PCR-RFLP para os iniciadores FliC(M) semelhantes entre si e semelhante à amostra H2. Entretanto na sorologia, a amostra 16C não reagiu com nenhum dos antissoros e a amostra 17C reagiu com os soros anti H38 e H48. Por isso, as duas amostras foram consideradas com perfil molecular de H2 (Tabela 7, Figura F e G).

As amostras 20C e 27C apresentaram PCR-RFLP utilizando o iniciador FliC(F) semelhantes àqueles das amostras padrão H38 e H33, respectivamente. Ambas foram então consideradas como pertencentes a cada um desses perfis e assim caracterizadas pela metodologia empregada. Lembrando que a amostra 27C apresentou reação cruzada na sorologia com os antissoros anti-H33 e anti-H53.

Quando da análise da amostra 4C, observou-se que os perfis de PCR-RFLP foram distintos das amostras H padrões. Entretanto na sorologia o antígeno produzido reagiu com os antissoros anti-H48 e anti-H54. Essa combinação H48/H54 nos fez inferir na possibilidade da amostra 4C possuir os genes de variação de fase. Os resultados da comparação dos perfis eletroforéticos das amostras estão descritos na Tabela 7, Figuras F e F.

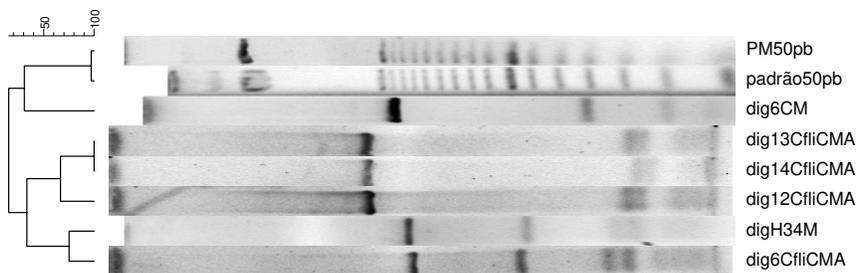


**Figura F:** Resultados da análise de similaridade entre os produtos PCR-RFLP obtidos com os iniciadores FliC(F) e com a enzima *RsaI* em amostras H padrão e *E.coli* isoladas de animais e alimentos gerados pelo programa GEL COMPAR II. PM100pb – padrão de peso molecular de 100 pb; dig – digerido.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

RFLP

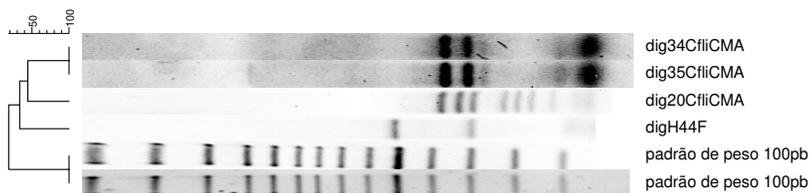
RFLP



Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

RFLPfields

RFLPfields



**Figura G:** Resultados da análise de similaridade entre os produtos PCR-RFLP obtidos com os iniciadores FliC(M) e com a enzima *HhaI* em amostras H padrão e *E.coli* isoladas de animais e alimentos, gerados pelo programa GEL COMPAR II. PM100pb – padrão de peso molecular de 100 pb; dig – digerido.

**Tabela 7: Perfis das amostras de *E. coli* HNT e amostras padrão para o antígeno H obtidos por PCR-RFLP e resultados de sorologia com antissoros H padrão.**

Amostra	RFLP <i>HhaI</i>	RFLP <i>RsaI</i>	Perfil Molecular	Sorologia convencional	Perfil característico
1C	NR*	H16	P13	NR	<b>H16</b>
2C	-**	H16	P13	NR	<b>H16</b>
3C	NR	37C/38C	-	NR	HNT
4C	-	-	-	H48/ H54	HNT
5C	NR	H34	P28	NR	<b>H34</b>
6C	H34	H34	P28	NR	<b>H34</b>
7C	NR	-	-	NR	HNT
8C	-	H34	P28	NR	<b>H34</b>
12C	13C/14C	-	-	NR	HNT
13C	12C/14C	14C	-	H38/ H51	HNT
14C	12C/13C	13C	-	H37/ H48/ H38	HNT
15C	-	39C	-	H3/ H8	HNT
16C	-	H2	P2	NR	<b>H2</b>
17C	-	H2	P2	H38/H48	<b>H2</b>
18C	-	36C	-	NR	HNT
19C	NR	-	-	NR	HNT
20C	H44	-	P32	NR	<b>H38</b>
21C	-	22C	-	NR	HNT
22C	-	21C	-	NR	HNT
26C	NR	-	-	NR	HNT
27C	-	H33	P27	H33/H53	<b>H33</b>
29C	-	-	-	NR	HNT
32C	-	-	-	NR	HNT
33C	-	-	-	NR	HNT
34C	35C	NR	-	NR	HNT
35C	34C	NR	-	NR	HNT
36C	-	18C	-	NR	HNT
37C	-	3C/38C	-	NR	HNT
38C	-	3C/37C	-	NR	HNT
39C	-	15C	-	H3/H8	HNT
40C	-	-	-	NR	HNT

\* NR: Não houve reação positiva em sorologia.

\*\* -: não houve perfil de digestão semelhante.

As amostras de *E. coli* HNT quando testadas em PCR-RFLP como os pares de iniciadores FliC(M) e FliC(F) e com *RsaI* geraram 20 perfis diferentes e as que apresentaram perfil não definido nem por sorologia, nem nessa metodologia foram selecionadas para dar continuidade ao seu estudo. Através do sequenciamento do gene *fliC*.

#### **4. Sequenciamento do gene *fliC* das amostras de *E. coli* HNT**

Amostras de *E.coli* por nós determinadas como HNT, ou seja, não tipável, pelos ensaios de PCR-RFLP do gene *fliC* tiveram esse gene seqüenciado visando sua caracterização molecular.

Foi empregada a técnica de sequenciamento “primer walking” ou “cromossomo walking”, utilizando os iniciadores descritos por Fields *et al.*(1997). Em algumas amostras, o sequenciamento dos fragmentos de DNA não se iniciava e, em outras reações, o número de bases nitrogenadas seqüenciadas era muito baixo. Em cinco amostras estudadas, obteve-se uma boa leitura das seqüências (aproximadamente 600pb) do gene *fliC*, o que nos deu parâmetros para compará-las às seqüências depositadas no *GenBank* (*NCBI database website*) e, portanto, caracterizá-las. Porém, foram necessárias aproximadamente cinco repetições de cada amostra para a obtenção de resultados confiáveis no sequenciamento. Foi utilizado o seqüenciador MegaBase 1000 (*GE Health Care*) do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular Bacteriana, sob supervisão e orientação do Prof. Dr. Marcelo Brocchi. Para o sequenciamento total do gene, contamos com a colaboração do Dr. Marcio José da Silva, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp.

As seqüências gênicas obtidas nas reações foram comparadas com os diferentes genes *fliC* armazenados no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) através do sistema BLAST e o programa ClustalW foi utilizado para alinhamento das seqüências. As amostras assim caracterizadas estão descritas na Tabela 8.

#### 4.1. Sequenciamento parcial do gene *fliC* das amostras de *E. coli* HNT

**Amostra 13C:** O gene apresentou 98% de similaridade com aquele da amostra padrão para H25 (AY250007), sendo então, caracterizado como tal antígeno. Pela análise da sequência protéica o gene expressaria a mesma proteína. Na posição 352 de leitura, a sequência muda o frame de leitura, tornando, então, a proteína inativa ou sem função.

##### Sequência protéica parcial:

```
emb|CAD97429.1| flagellin [Escherichia coli]
Frame = +2

Query 5 LSTSIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISLAQTTEGALSE 184
Sbjct 23 LSTSIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISLAQTTEGALSE 82

Query 185 INNNLQRVRELTVQATTGTNSDSLSSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVMFFPK 352
Sbjct 83 INNNLQRVRELTVQATTGTNSDSLSSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVMF K 138

Frame = +1

Query 340 VLSKDGSMKIQVGANDGQTISIDLKKIDSSTLGLNGFSVSKNS 468
Sbjct 135 VLSKDGSMKIQVGANDGQTISIDLKKIDSSTLGLNGFSVSKNS 177
```

**Amostra 14C:** O gene apresentou 98% de similaridade com aquele da amostra padrão para o antígeno H25 (AY250007), através da análise da sequência de aminoácidos da proteína gerada, caracterizamos como H25, pois a mesma apresentou alta similaridade com antígeno H25.

##### Sequência protéica parcial:

```
gb|AAP13315.1| FliC [Escherichia coli]
Frame = +2

Query 14 TSIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISLAQTTEGALSEIN 193
Sbjct 4 TSIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISLAQTTEGALSEIN 63

Query 194 NNLQRVRELTVQATTGTNSDSLSSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVNVLSKDGSMKI 373
Sbjct 64 NNLQRVRELTVQATTGTNSDSLSSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVNVLSKDGSMKI 123

Query 374 QVGANDGQTISIDLKKIDSSTLGLNGFSVSKNSLNVSNaitsIPQAAGND 523
Sbjct 124 QVGANDGQTISIDLKKIDSSTLGLNGFSVSKNSLNVSNaitsIPQAAGND 173
```

**Amostra 21C:** O gene teve 611 bases sequenciadas e apresentou 99% de homologia com o gene *fliC* da amostra padrão para antígeno H7 (AF228496). A análise da sequência protéica

resultou em 100% de similaridade com a proteína H7. A amostra então foi caracterizada como portadora do antígeno H7.

### Sequencia protéica parcial:

```
gb|AAD28529.2|AF128958_1 flagellin [Escherichia coli]
Frame = +1
Query 43 RINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISVAQTTEGALSEINNNLQRIRELT 222
Sbjct 16 RINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISVAQTTEGALSEINNNLQRIRELT 75
Query 223 VQATTGTNSDSLDSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVNVLAQDGSMMKIQVGANDGETI 402
Sbjct 76 VQATTGTNSDSLDSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVNVLAQDGSMMKIQVGANDGETI 135
Query 403 TIDLKKIDSDTLGLNGFNVNGKGTITNKAATVSDLTSAGAKL
Sbjct 136 TIDLKKIDSDTLGLNGFNVNGKGTITNKAATVSDLTSAGAKL
```

**Amostra 22C:** O gene apresentou 99% de similaridade para aquele da amostra padrão para antígeno H7 (AB334575), sendo então, caracterizada como tal antígeno, pois através da análise da sequência protéica, o gene expressaria a mesma proteína. Na posição 150 de leitura, a sequência muda o frame de leitura, tornando, então, a proteína inativa.

### Sequência protéica parcial:

```
gb|AAF71901.1| flagellin [Escherichia coli]
Frame = -2
Query 551 SKDVVLSETKAAAATSSITFNSGVLSKTIGFTAGESSDAAKSYVDDKGGITNVADYTVSY 372
Sbjct 384 SKDVVLSETKAAAATSSITFNSGVLSKTIGFTAGESSDAAKSYVDDKGGITNVADYTVSY 443
Query 371 SVNKDNGSVTVAGYASATDTNKDYAPAIGTAVNVNSAGKITTETTSAGSATNPLAALDD 192
Sbjct 444 SVNKDNGSVTVAGYASATDTNKDYAPAIGTAVNVNSAGKITTETTSAGSATNPLAALDD 503
Query 191 AISSIDKFRSSLGA 150
Sbjct 504 AISSIDKFRSSLV 517
Frame = -3
Query 148 IQNRLDSAVTNLNNTTTLNSEAQSRIQDADYATEVSN
Sbjct 518 IQNRLDSAVTNLNNTTTLNSEAQSRIQDADYATEVSN
```

**Amostra 32C:** A amostra apresentou 99% de similaridade do gene com aquele da amostra padrão H32 (AY250014), sendo então, caracterizada como tal antígeno, pois através da análise da

sequência protéica o gene expressaria a mesma proteína, apesar de haver mutações sinônimas e não sinônimas. Como há dois pontos de mudança de frame, a amostra foi caracterizada como antígeno H32, porém já é sabido que a proteína é inativa.

### Sequência protéica parcial:

```
gb|AAP13322.1| FliC [Escherichia coli]
Frame = -3

Query 488  ALTGQAYTVANGAQSVDVAADGAVTATTGGATVNI GAEGELTTAANKTVTETYHEFANGN 309
                ALTGQAYTVANGAQSVDVAADGAVTATTGGATVNI GAEGELTTAANKTVTETYHEFANGN
Sbjct 392  ALTGQAYTVANGAQSVDVAADGAVTATTGGATVNI GAEGELTTAANKTVTETYHEFANGN 451

Query 308  ILDDDGAALYKAADGSLTTEATGKSEATTDPLKALDDAIASVDKFRSSLGAVQNRL 138
                ILDDDGAALYKAADGSLTTEATGKSEATTDPLKALDDAIASVDKFRSSLGAVQNRL+
Sbjct 452  ILDDDGAALYKAADGSLTTEATGKSEATTDPLKALDDAIASVDKFRSSLGAVQNRLD 508

Frame = -2

Query 99   LSEAQSRIQDADYATEVSNMSKAQIFSSS 13
                LSEAQSRIQDADYATEVSNMSKAQIFSS+
Sbjct 521  LSEAQSRIQDADYATEVSNMSKAQIFSSA 549

Frame = -2

Query 549  QVSNNVBIKGATVSAEDMNTCV 484
                QVSNNV+IKGATVSAEDMNT +
Sbjct 372  QVSNNVDIKGATVSAEDMNTAL 393
```

**Amostras 29C e 33C:** Foram obtidas sequências parciais das amostras 29C e 33C. A amostra 29C apresentou 92% de similaridade com o gene de flagelina H18. A amostra 33C apresentou 86% de similaridade com o gene *fliC* de *Salmonella enterica*. Contudo, o número de bases seqüenciadas foi relativamente pequeno. Inúmeras tentativas de se obter sequências confiáveis foram realizadas, porém sem sucesso. Por sugerir um novo gene de expressão de flagelina, essas amostras foram selecionadas para obtenção de antissoros.

#### 4.2. Sequenciamento total do gene do gene *fliC*

**Amostra 3C:** A amostra de *E.coli* 3C apresentou 99% de similaridade com os genes das amostras de *E.coli* padrão H2 e H35. Quando a seqüência gênica foi traduzida evidenciou 100% de similaridade com a seqüência protéica da flagelina H2, apresentando um aminoácido de diferente na seqüência protéica de H35. Pela sorologia a amostra 3C não reagiu com os antissoros

H2 e H35. Portanto, expressa o antígeno H2, porém apresenta características que a distingue dos demais genes já descritos e foi por nós considerado como gene *fliC<sub>H2</sub>*.

### Sequencia nucleotídica total do gene *fliC<sub>H2</sub>*: 1497 bases – HQ116826 (acesso GenBank)

**TTAACCCCTGCAGCAGAGACAGTACGTTCTGCGTGGTCTGGTTAGCCTGTGCCAGAACAGAAGTACCTGCTTGTTCAGGATCTGCGCAGAGACATG**  
 TTAGACACTTCGGTCGCGTAGTCAGCATCTTCGATACGGCTACGGGCAGAAGACAGGTTGTTTACGGTGTGCCAAGGTTGGTGATGGCAGAGTCGA  
 AACGATTTTGAATTGCACCTAGGTTAGAACGCAACGAGTCAACCTGAGACAGTGCCTTTATCGATAGCAGCCAAAGGATCTTCTGTTTTCTGCGTAGA  
 AATTGCTGCAATAGAAATCAGTTTTTCAGGCTCTTACCTTGAAATCACTAACACTGTAAGTTTTGCCATCGGTTGCAGTTACAACCTTCGGTTTTGCCA  
 TCGCTTCCACCCAGTTCAACTTTAACATTGTCGTGTTTACACCGTACAGCATCAGTGTAAAGACATTGTTTTAACGGAAACTGCTCCTGTTTTCTGAT  
 CAACATTCGCTGCATACTGTTTACCGTACATACCAATCAACGCAAATGAACAGTATCTTTGCCATTGGCGCTTCTAACTTAAAGAGTTTTGCACC  
 TGTGATAGAAGCGGTTGCGGTATCAGTACCCAATGAACATCAATAGCCCCCTTCCCTTTCACCGTTGTGACTTCCTTTAAATTACCAGCTTGAGGC  
 TGGTACCCTAGAGCCCCAGCTTACGCTTACCTGCATCAGGAGATGTCGGATCATCTCCACAGTAACTTATAATAACCATTTTCAGCGGTT  
 TATCTGAACCGGCAACTTAACTGTAACAATTACCGTTAGCATCAGACATAATATTACCGTACAGTTGGCCCGGAGTCTGATGCTTTAACTGTAGC  
 TGTAAATATCGATCAAGTGTATTAGCGTCAGCAAGCTTAACTGTTCGATCCAAAATAGGTTGTTTCAGCCGTTGCGGCTTTTAAATTTAGTAGGATCT  
 TTAATACCAAAACAGATAATCCAGTGTGTCGGAATTAATTTCTGCAGTTTAAATAGTAATTGTTTCGCCGTCGTTTGACCAACCTGAATAGTCA  
 TATCTGATCAGAAAGCCAGCACTTAAACGCCGTTAAACTGAGTCTGACCAGAAACACCGTCAATTTCACTCAGACGCTGTGGATTTTCGGACTGGAT  
 GGAGGTCAGGTCAGTGTGTCAGAGTTAGTACCGTTAGTTGCTGAACAGAAAGTTACGAAATACGCTGCAGGTTGTTGTTAAATTTCACTCAGCGCACCT  
 TCAGTGGTCTGCGCAACGAAATACCATCATTCGCGTTACGGGAAGCCTGAGTCAGACCTTAAATATTGCTGTAAAACGGTTAGCAATCGCCTGAC  
 CTGCTGCGTCATCTTTAGCACTGTTAATACGCAGGCCAGAAGAGAGACGTTCAATGGCCGAGCTCAGAGAAGACTGAGATTTGTTTCAGGTTATTCTG  
 GGTCACACGCGACAGGCT**GTGGTTGATTAATGACTTGTGCCAT**

AP010958.1 |  *Escherichia coli* O103:H2 str. 12009 DNA, complete genome  
 Features in this part of subject sequence: [flagellin](#)

Query	9	GCAGCAGAGACAGTACGTTCTGCGTGGTCTGGTTAGCCTGTGCCAGAACAGAAGTACCTG	68
Sbjct	2243220	GCAGCAGAGACAGTACGTTCTGCGTGGTCTGGTTAGCCTGTGCCAGAACAGAAGTACCTG	2243279
Query	69	CTTGTTGCAGGATCTGCGCAGGACATGTTAGACACTTCGGTCGCGTAGTCAGCATCTT	128
Sbjct	2243280	CTTGTTGCAGGATCTGCGCAGGACATGTTAGACACTTCGGTCGCGTAGTCAGCATCTT	2243339
Query	129	CGATACGGCTACGGGCAGAAGACAGGTTGTTTACGGTGTGCCAAGGTTGGTGATGGCAG	188
Sbjct	2243340	CGATACGGCTACGGGCAGAAGACAGGTTGTTTACGGTGTGCCAAGGTTGGTGATGGCAG	2243399
Query	189	AGTCGAAACGATTTTGAATTGCACCTAGGTTAGAACGCAACGAGTCAACCTGAGACAGTG	248
Sbjct	2243400	AGTCGAAACGATTTTGAATTGCACCTAGGTTAGAACGCAACGAGTCAACCTGAGACAGTG	2243459
Query	249	CTTTATCGATAGCAGCCAAAGGATCTTCTGTTTTCTGCGTAGAAATTGCTGCAATAGAAT	308
Sbjct	2243460	CTTTATCGATAGCAGCCAAAGGATCTTCTGTTTTCTGCGTAGAAATTGCTGCAATAGAAT	2243519
Query	309	CAGTTTTTCAGGCTCTTACCTTGTAATCACTAACACTGTAAGTTTTGCCATCGGTTGCAG	368
Sbjct	2243520	CAGTTTTTCAGGCTCTTACCTTGTAATCACTAACACTGTAAGTTTTGCCATCGGTTGCAG	2243579
Query	369	TTACAACCTCGGTTTTGCCATCGCTTCCACCCAGTTCAACTTTAACATTGTCGTGTTTGA	428
Sbjct	2243580	TTACAACCTCGGTTTTGCCATCGCTTCCACCCAGTTCAACTTTAACATTGTCGTGTTTGA	2243639
Query	429	CACCGTCAGCATCAGTGTAAAGACATTGTTTTAACGGAAACTGCTCCTGTTTTCTGATCAA	488
Sbjct	2243640	CACCGTCAGCATCAGTGTAAAGACATTGTTTTAACGGAAACTGCTCCTGTTTTCTGATCAA	2243699
Query	489	CATTCGCTGCATACTGTTTACCGTACATACCAATCAACGCAAATGAACAGTATCTTTGC	548
Sbjct	2243700	CATTCGCTGCATACTGTTTACCGTACATACCAATCAACGCAAATGAACAGTATCTTTGC	2243759
Query	549	CATTGGCGTCTTCTAACTTAAAGAGTTTTGCACCTGTGATAGAAGCGGTTGCGGTATCAG	608
Sbjct	2243760	CATTGGCGTCTTCTAACTTAAAGAGTTTTGCACCTGTGATAGAAGCGGTTGCGGTATCAG	2243819
Query	609	TACCCAACCTGAACATCAATAGCCCCCTTCCCTTTCACCGTTGTGACTTCCTTTAAATTAC	668

Sbjct	2243820	 TACCCAAC TGAACATCAATAGCCCCCTTCCTTTACCGTTGTGACTTCCTTTAAATTAC	2243879
Query	669	CAGCTTGAGGCTGGGTACCCGCTAGAGCCCCAGCTTACCTGCATCAGGAGATG	728
Sbjct	2243880	 CAGCTTGAGGCTGGGTACCCGCTAGAGCCCCAGCTTACCTGCATCAGGAGATG	2243939
Query	729	TCGGATCATCCTCCACAGTAACTTCATAATAACCATTTTCAGCGGGTTATCTGAACCGG	788
Sbjct	2243940	 TCGGATCATCCTCCACAGTAACTTCATAATAACCATTTTCAGCGGGTTATCTGAACCGG	2243999
Query	789	CAACTTTAACGTACAAC TACCCTTAGCATCAGACATAATATTACCGTCACGTTGGCCCG	848
Sbjct	2244000	 CAACTTTAACGTACAAC TACCCTTAGCATCAGACATAATATTACCGTCACGTTGGCCCG	2244059
Query	849	GAGTCGTAGTGCCTTTAACTGTAGCTGTAATATCTGCATCAAGTGTATTAGCGTCAGCAA	908
Sbjct	2244060	 GAGTCGTAGTGCCTTTAACTGTAGCTGTAATATCTGCATCAAGTGTATTAGCGTCAGCAA	2244119
Query	909	GCTTAACTGTCGATCCAAAATAGGTTGTTTCAGCCGTTGCGGCTTTTAAATTTAGTAGGAT	968
Sbjct	2244120	 GCTTAACTGTCGATCCAAAATAGGTTGTTTCAGCCGTTGCGGCTTTTAAATTTAGTAGGAT	2244179
Query	969	CTTTAAATACCAAACCAGATAATCCAGTGTGTGCGAATTAATTTCTGCAGTTAATAG	1028
Sbjct	2244180	 CTTTAAATACCAAACCAGATAATCCAGTGTGTGCGAATTAATTTCTGCAGTTAATAG	2244239
Query	1029	TAATTGTTTCGCCGTCGTTTGACCAACCTGAATAGTCATATCTGATCAGAAGCCAGCA	1088
Sbjct	2244240	 TAATTGTTTCGCCGTCGTTTGACCAACCTGAATAGTCATATCTGATCAGAAGCCAGCA	2244299
Query	1089	CTTTAACGCCGTTAAACTGAGTCTGACCAGAAACACGGTCAATTTCACTCAGACGCTGCT	1148
Sbjct	2244300	 CTTTAACGCCGTTAAACTGAGTCTGACCAGAAACACGGTCAATTTCACTCAGACGCTGCT	2244359
Query	1149	GGATTTTCGGACTGGATGGAGGTCAGGTCAGTGTGACAGTTAGTACCGTTAGTTGCCTGAA	1208
Sbjct	2244360	 GGATTTTCGGACTGGATGGAGGTCAGGTCAGTGTGACAGTTAGTACCGTTAGTTGCCTGAA	2244419
Query	1209	CAGAAAGTTCACGAATACGCTGCAGGTTGTTGTTAATTTCAATTCAGCGCACCTTCAGTGG	1268
Sbjct	2244420	 CAGAAAGTTCACGAATACGCTGCAGGTTGTTGTTAATTTCAATTCAGCGCACCTTCAGTGG	2244479
Query	1269	TCTGCGCAACAGAAATACCATCATTTCGCGTTACGGGAAGCCTGAGTCAGACCTTTAATAT	1328
Sbjct	2244480	 TCTGCGCAACAGAAATACCATCATTTCGCGTTACGGGAAGCCTGAGTCAGACCTTTAATAT	2244539
Query	1329	TTGCTGTAAAACGGTTAGCAATCGCCTGACCTGCTGCGTCATCTTTAGCACTGTTAATAC	1388
Sbjct	2244540	 TTGCTGTAAAACGGTTAGCAATCGCCTGACCTGCTGCGTCATCTTTAGCACTGTTAATAC	2244599
Query	1389	GCAGGCCAGAAGAGAGACGTTCAATGGCGGAGCTCAGAGAAGACTGAGATTTGTTTCAGGT	1448
Sbjct	2244600	 GCAGGCCAGAAGAGAGACGTTCAATGGCGGAGCTCAGAGAAGACTGAGATTTGTTTCAGGT	2244659
Query	1449	TATTCTGGGTCAACAGCGACAGGCTGTTTGTATTAATGACTTGTGCCAT	1497
Sbjct	2244660	 TATTCTGGGTCAACAGCGACAGGCTGTTTGTATTAATGACTTGTGCCAT	2244708

## Sequência de aminoácidos: frame -1

**Met** A Q V I N T N S L S L L T Q N N L N K S Q S S L S S A I E R L S S G L R I N S A K D D A A G Q  
A I A N R F T A N I K G L T Q A S R N A N D G I S V A Q T T E G A L N E I N N N L Q R I R E L S V  
Q A T N G T N S D S D L T S I Q S E I Q Q R L S E I D R V S G Q T Q F N G V K V L A S D Q D **Met** T  
I Q V G A N D G E T I T I K L Q E I N S D T L G L S G F G I K D P T K L K A A T A E T T Y F G S T  
V K L A D A N T L D A D I T A T V K G T T T P G Q R D G N I **Met** S D A N G K L Y V K V A G S D K P  
A E N G Y Y E V T V E D D P T S P D A G K L K L G A L A G T Q P Q A G N L K E V T T V K G K G A I  
D V Q L G T D T A T A S I T G A K L F K L E D A N G K D T G S F A L I G D D G K Q Y A A N V D Q K  
T G A V S V K T **Met** S Y T D A D G V K H D N V K V E L G G S D G K T E V V T A T D G K T Y S V S D  
L Q G K S L K T D S I A A I S T Q K T E D P L A A I D K A L S Q V D S L R S N L G A I Q N R F D S

A I T N L G N T V N N L S S A R S R I E D A D Y A T E V S N **Met** S R A Q I L Q Q A G T S V L A Q A  
 N Q T T Q N V L S L L Q G **Stop**

### Amostra 4C:

O sequenciamento do gene *fliC* da amostra de *E.coli* 4C gerou um fragmento de 1406 pares de bases. Quando analisadas no sistema BLAST o gene apresentou 100% de similaridade com o gene *fliC* descrito pela Dra. Monique Ribeiro Tiba, um gene recentemente caracterizado de uma amostra de *E. coli* isolada de humano e que apresentava perfil sorológico HNT com número de acesso ao GenBank GQ423574. Este gene expressa uma flagelina ainda não descrita e cujo antissoro já foi produzido.

### Sequencia nucleotídica total do gene *fliC*<sub>4C</sub>: 1481 bases – HQ116827 (acesso GenBank)

**CTAACCC**TGCAGCAGAGACAGTACGTTCTGCGTGGTCTGGTTAGCCTGTGCCAGAACAGAGGTACCCGCTTGTGTCAGGATCTGCGCACGAGACATG  
 TTAGACACTTCGATCGCGTAGTCAGCATCTTCGATACGGCTACGGGCAGAAGACAGGTTGTTTACGGTGTGCCAAGGTTGGTGATGGCAGAGTCGA  
 AACGGTTTTGTACTGCACCGAGGTCAGAACGCAGATTGTCAACTTTAGCCAATGCTTTGTTCGATAGTTTCGAGCGGGTGGTGGTAGATTGCAACGA  
 TTTTGCTGCATCTTCGTTTACCAGAATCGGGCTACCACCTTCTGATTGCTCAGATACATGACTTTATTGTTACCAGAAGCAGTCTCCGTTATCGTT  
 TTACCATCTGCACCTAACATCGTAAGTTGCACCGTTAAACAATAACGTGCTTCCCTGTTTCTTGGCAGCGTTCAGATCAAGATCAGATAGTGTGCTG  
 CTTTATTTTCAACTTTTGTGTCAGTCAATTGCCTGCACATTTTTGTATAGGGCTGTGCTAGGGGCAACGGTTGCACCTAGTACCTGATGTATCAGT  
 ACTCCCCGAAATAGTGAATTCAACAGCCTTACCATCAACATTGGCGGTTAATTTACCATTACCTTTGGCATCTATAGCGACAGTCCCGGTTATTGTA  
 AATTCGATACCTTCGTAGACAATCTTATCCCTTGAGCTAAATCTTTAGCAGCCACTGCAAGCTTAGTTGCATCAATCTTGAATTGAGTATCACTGC  
 TGGTCGTAAGTGAAACATCCGCAGTACTCACATAAACTGTTTGGCATCTTTATCCTGTACTACGCCACTATCTACATTAACAGTATAGTTATCAGT  
 ACCGTTAATTTGATAATTATCAGTACCTGTGCTTTAAATTTAGAAATCAGGTCACCTGCCGGTTGCTTCTGCGCGCCATCGATATTAACACCGTCC  
 AGGCCGAGAGTTTTTCGCATCAATTTTGGCAGATTGATAGTGATGGTTTCACCATCATTAGCACCAACCTGAATTTTCATTTTATTATTTTCAGCAA  
 GGACTTTTCAGCCGTTAAACTGAGTTTGGCTCAGATACCGGTTCAATTTCTCCAGACGTTGAGTAATTTAGCCTGGATAGAAGAAAGATCGCTGTC  
 AGAGTTAGTACCGTTAGTTGCCTGAACGAAAGTTACGAATACGCTGCAGGTTGTTGTTAATTTTCATTCAGCGCACCTTCAGTGGTCTGCGCAACA  
 GAAATACCATCATTCCGCTTACGGGAAGCCTGAGTCAGACCTTAAATATTTGCTGTAAACCGTTAGCAATCGCCTGACCTGTGCGTCATCTTTAG  
 CACTGTTAATACGAGGTCAGAGAGAGGTTCAATGGCGGAGCTCAGAGAAGACTGAGATTTGTTTCAGGTTATTCTGGGATCAACAGCGACAGGC  
**TGTTGGGTATTAATGACTTGTGCCAT**

GQ423574 *Escherichia coli* strain VTH-15 flagellin-like (*fliC*) gene, complete sequence

Query	1	CTAACCC	TGCAGCAGAGACAGTACGTTCTGCGTGGTCTGGTTAGCCTGTGCCAGAACAGA	60
Sbjct	18	CTAACCC	TGCAGCAGAGACAGTACGTTCTGCGTGGTCTGGTTAGCCTGTGCCAGAACAGA	77
Query	61	GGTACCCGCTTGTGTCAGGATCTGCGCACGAGACATGTTAGACACTTCGATCGCGTAGTC		120
Sbjct	78	GGTACCCGCTTGTGTCAGGATCTGCGCACGAGACATGTTAGACACTTCGATCGCGTAGTC		137
Query	121	AGCATCTTCGATACGGCTACGGGCAGAAGACAGGTTGTTTACGGTGTGCCAAGGTTGGT		180
Sbjct	138	AGCATCTTCGATACGGCTACGGGCAGAAGACAGGTTGTTTACGGTGTGCCAAGGTTGGT		197
Query	181	GATGGCAGAGTCGAAACGGTTTTGTACTGCACCGAGGTCAGAACGCAGATTGTCAACTTT		240
Sbjct	198	GATGGCAGAGTCGAAACGGTTTTGTACTGCACCGAGGTCAGAACGCAGATTGTCAACTTT		257
Query	241	AGCCAATGCTTTGTTCGATAGTTTCGAGCGGGTTGGTGGTAGATTGCAACGATTTTGTGTC		300
Sbjct	258	AGCCAATGCTTTGTTCGATAGTTTCGAGCGGGTTGGTGGTAGATTGCAACGATTTTGTGTC		317
Query	301	ATCTTCGTTTACCAGAATCGGGCTACCACCTTCTGATTGCTCAGATACATGACTTTATT		360
Sbjct	318	ATCTTCGTTTACCAGAATCGGGCTACCACCTTCTGATTGCTCAGATACATGACTTTATT		377

Query 361 GTTACCAGAAGCAGTCTCCGTTATCGTTTTACCATCTGCTAACAATCGTAAGTTGCACC 420  
 |||  
 Sbjct 378 GTTACCAGAAGCAGTCTCCGTTATCGTTTTACCATCTGCTAACAATCGTAAGTTGCACC 437  
 |||  
 Query 421 GTTAAACAACTAACGTGCTTCTGTTTTCTTGGCAGCGTTCAGATCAAGATCAGATAGTGT 480  
 |||  
 Sbjct 438 GTTAAACAACTAACGTGCTTCTGTTTTCTTGGCAGCGTTCAGATCAAGATCAGATAGTGT 497  
 |||  
 Query 481 CGCTGCTTTATTTCAACTTTTGTGTCAGTCAATTGCCCTGCTACTATTTTGTATAGGGC 540  
 |||  
 Sbjct 498 CGCTGCTTTATTTCAACTTTTGTGTCAGTCAATTGCCCTGCTACTATTTTGTATAGGGC 557  
 |||  
 Query 541 TGTCGTAGGGGCAACGGTTGCTACTAGTACCTGATGTATCAGTACTCCCCGAAATAGTGAA 600  
 |||  
 Sbjct 558 TGTCGTAGGGGCAACGGTTGCTACTAGTACCTGATGTATCAGTACTCCCCGAAATAGTGAA 617  
 |||  
 Query 601 TTCAACAGCCTTACCATCAACATTGGCGGTTAATTTACCATTACCTTTGGCATCTATAGC 660  
 |||  
 Sbjct 618 TTCAACAGCCTTACCATCAACATTGGCGGTTAATTTACCATTACCTTTGGCATCTATAGC 677  
 |||  
 Query 661 GACAGTGCCGGTATTTGTAATTCGATACCTTCGTAGACAATCTTATTCCTTGAGCTAA 720  
 |||  
 Sbjct 678 GACAGTGCCGGTATTTGTAATTCGATACCTTCGTAGACAATCTTATTCCTTGAGCTAA 737  
 |||  
 Query 721 ATCTTTAGCAGCCACTGCAAGCTTAGTTGCATCAATCTTGAATTGAGTATCACTGCTGGT 780  
 |||  
 Sbjct 738 ATCTTTAGCAGCCACTGCAAGCTTAGTTGCATCAATCTTGAATTGAGTATCACTGCTGGT 797  
 |||  
 Query 781 CGTAAGTGAACCATCCGCAGTACTCACATAAACTTGTTTGCCATCTTTATCCTGTACTAC 840  
 |||  
 Sbjct 798 CGTAAGTGAACCATCCGCAGTACTCACATAAACTTGTTTGCCATCTTTATCCTGTACTAC 857  
 |||  
 Query 841 GCCACTATCTACATTAACAGTATAGTTATCAGTACCGTTAATTTGATAATTATCAGTACC 900  
 |||  
 Sbjct 858 GCCACTATCTACATTAACAGTATAGTTATCAGTACCGTTAATTTGATAATTATCAGTACC 917  
 |||  
 Query 901 TGTCGCTTTAAATTTAGAAATCAGGTCAGTCCGGTTGCTTTCTGCGGCCATCGATATT 960  
 |||  
 Sbjct 918 TGTCGCTTTAAATTTAGAAATCAGGTCAGTCCGGTTGCTTTCTGCGGCCATCGATATT 977  
 |||  
 Query 961 AAAACCGTCCAGGCCGAGAGTTTTCGCATCAATTTTGGCAGATTGATAGTGATGGTTTC 1020  
 |||  
 Sbjct 978 AAAACCGTCCAGGCCGAGAGTTTTCGCATCAATTTTGGCAGATTGATAGTGATGGTTTC 1037  
 |||  
 Query 1021 ACCATCATTAGCACCAACCTGAATTTTCATTTTATTATTTTCAGCAAGGACTTTCAGGCC 1080  
 |||  
 Sbjct 1038 ACCATCATTAGCACCAACCTGAATTTTCATTTTATTATTTTCAGCAAGGACTTTCAGGCC 1097  
 |||  
 Query 1081 GTTAAACTGAGTTTGCTCAGATACACGGTCAATTTCTTCCAGACGTTGAGTAATTTAGC 1140  
 |||  
 Sbjct 1098 GTTAAACTGAGTTTGCTCAGATACACGGTCAATTTCTTCCAGACGTTGAGTAATTTAGC 1157  
 |||  
 Query 1141 CTGGATAGAAGAAAGATCGCTGTCAGAGTTAGTACCGTTAGTTGCCTGAACAGAAAGTTC 1200  
 |||  
 Sbjct 1158 CTGGATAGAAGAAAGATCGCTGTCAGAGTTAGTACCGTTAGTTGCCTGAACAGAAAGTTC 1217  
 |||  
 Query 1201 ACGAATACGCTGCAGGTTGTTGTTAATTTTCATTCAGCGCACCTTCAGTGGTCTGCGCAAC 1260  
 |||  
 Sbjct 1218 ACGAATACGCTGCAGGTTGTTGTTAATTTTCATTCAGCGCACCTTCAGTGGTCTGCGCAAC 1277  
 |||  
 Query 1261 AGAAATACCATCATTTCGCGTTACGGGAAGCCTGAGTCAGACCTTTAATATTTGCTGTAAA 1320  
 |||  
 Sbjct 1278 AGAAATACCATCATTTCGCGTTACGGGAAGCCTGAGTCAGACCTTTAATATTTGCTGTAAA 1337  
 |||  
 Query 1321 ACGGTTAGCAATCGCCTGACCTGCTGCGTCATCTTTAGCACTGTTAATACGCAGGCCAGA 1380  
 |||  
 Sbjct 1338 ACGGTTAGCAATCGCCTGACCTGCTGCGTCATCTTTAGCACTGTTAATACGCAGGCCAGA 1397  
 |||  
 Query 1381 AGAGAGACGTTCAATGGCGGAGCTCAGAGAAGACTGAGATTTGTTTCAGGTTATTTCTGGGA 1440  
 |||  
 Sbjct 1398 AGAGAGACGTTCAATGGCGGAGCTCAGAGAAGACTGAGATTTGTTTCAGGTTATTTCTGGGA 1457  
 |||  
 Query 1441 TCAACAGCGACAGGCTGTTGGGTATTAATGACTTGTGCCAT 1481

Sbjct 1458 TCAACAGCGACAGGCTGTTGGGTATTAATGACTTGTGCCAT 1498

### Sequencia de aminoácidos: frame -3

S Q N N L N K S Q S S L S S A I E R L S S G L R I N S A K D D A A G Q A I A N R F T A N I K G L T  
 Q A S R N A N D G I S V A Q T T E G A L N E I N N N L Q R I R E L S V Q A T N G T N S D S D L S S  
 I Q A E I T Q R L E E I D R V S E Q T Q F N G V K V L A E N N E **Met** K I Q V G A N D G E T I T I N  
 L A K I D A K T L G L D G F N I D G A Q K A T G S D L I S K F K A T G T D N Y Q I N G T D N Y T V  
 N V D S G V V Q D K D G K Q V Y V S T A D G S L T T S S D T Q F K I D A T K L A V A A K D L A Q G  
 N K I V Y E G I E F T N T G T V A I D A K G N G K L T A N V D G K A V E F T I S G S T D T S G T S  
 A T V A P T T A L Y K N S A G Q L T A T K V E N K A A T L S D L D L N A A K K T G S T L V V N G A  
 T Y D V S A D G K T I T E T A S G N N K V **Met** Y L S K S E G G S P I L V N E D A A K S L Q S T T N  
 P L E T I D K A L A K V D N L R S D L G A V Q N R F D S A I T N L G N T V N N L S S A R S R I E D  
 A D Y A I E V S N **Met** S R A Q I L Q Q A G T S V L A Q A N Q T T Q N V L S L L Q G **Stop**

**Amostra 40C:** A amostra de *E.coli* 40C gerou um produto de 1718 pares de bases e mereceu destaque por apresentar *fliC* semelhante a *Shigella boydii*, além de *Escherichia coli*.

### Sequencia nucleotídica total do gene *fliC*<sub>40C</sub>: 1707 bases – HQ116828 (acesso ao GenBank)

**ATGGCACAAAGTCATTAATACCAACAGC**CTCTCGCTGATCACTCAAATAATATCAACAAGAACCAGTCTGCGCTGTCGAGTTCTATCGAACGTCGTGCTTCTGGCTTGCATTAACAGCGCGAAGGATGACGCCGGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTTTACTTCTAACATTAAGGCCTGACTCAGGCTGCACGTAACGCCAACGACGGTATTTCTGTTGCGCAGACCACCGAAGGCGCGCTGTCCGAAATTAACAACAACCTTACAGCGTATTCGTGAACCTGACGGTTACAGGCTTCTACCGGGACTAACTCTGATTCGGATCTGGACTCCATTAGGACGAAATCAAATCCCGTCTCGACGAAATAGACCGCGTATCCGGTCAGACCCAGTTCAGCGGTGAACCTGACTGCGCAAAAGACCGTTCTGATGAAAATTCAGTTGGTGGCAGATGACGGCCAGACTATCATTGATCTGAAGAAATTTGACTCTGATACGCTGGGGCTGAATGGTTTTAACGTTAACGGCAAAGGACTATTGCGAACAAGCTGCTACAGTCAGCGATCTGACCGCTGCTGGTCAACGGGAACAGGTCCTTATGCTGTGACCACAAACAATACAGCTCTCAGCGCTAGCGATGCACTGTCTCGCCTGAAAACCGGAGATACAGTTACTACTACTGGCTCGAGTGTGCGACCTATACTTATGATGCGGGTAAAGGGAACCTCACCACCTCAAGCAACAGTTGCAGATGGCGATGTTGTTAACTTTGCAAATACTCTGAAAACAGCGGCTGGCACTACTGCATCAGGTGTTTATACTCGTAGTACCGGTGATGTGAAGTTGATGTAGATGCTAATGGCGATGTGACCATCGGTGGTAAAGCCGGTACCTGGACGCCACTGGTAACCTATCTACAACAACCGCCGGCATTGCATCTTACGCGAAATTTGCCGATCTGTTGCTAGCGGTAGTACTTTAGCGACAACCTGGTTCTATCCAGCTGTCTGGCACAACCTATAACTTTGGTGTGCGGCAACTTCTGGCGTAACCTACACCAAACCGGTAAGTGTGATACTGTTCTGAGCACAGTACAGAGTGTGCAACCGGTAACACAGCAGTTACTGGTGCACAATTAAGTATAATACAGGTATTCAGTCTGCAACTCGCTCCTTCGGTGGTGCAGTAATAATGGTGTGGTAAATTCGAATGACACCTATACTGTCAGACACAAGAGGTCACACAAACCGCATCTTACACTATCAACTACAACGTCGATAAGGATACCGGTACAGTAACCTGTAGCTTCAAATGGCGCAGGTGCAACTGGTAAATTTGCAGCTACTGTTGGGGCAGCGCTTATGTTAACTCTACAGGTAACTGACCACTGAAACCACCGAGTGCAGGCACTGCAACCAAAGATCCTCTGGCTGCCCTGGACGACGCTATCAGCTCCATCGACAATTCGGTTATCCCTGGGTGTATCCAGAACCCTGCGATTCTGCGGTGACTAACCTGAACAACACCCTACCAACCTGTGAAGCCCGTATTCAGGACGCTGACTATGGACCGAAGTGTCCAACATGTGCAAGCGCGAGATTATCCAGCAGCCGGTAACTCGTGCTGGCAAAGCCAAACCAGGTACCGCAGCAGGTTCT**GTCTCTGCTGCAGGTTAA**

[CU928164.2](#)  *Escherichia coli* IAI39 chromosome, complete genome  
 Features in this part of subject sequence: [flagellar filament structural protein, flagellin](#)

Query	1	ATGGCACAAAGTCATTAATACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAATAATATCAACAAG	60
Sbjct	1203228	ATGGCACAAAGTCATTAATACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAATAATATCAACAAG	1203287
Query	61	AACCAGTCTGCGCTGTGCGATTCTATCGAACGCTGTCTTCTGGCTTGCATTAACAGC	120
Sbjct	1203288	AACCAGTCTGCGCTGTGCGATTCTATCGAGCGTCTGTCTTCTGGCTTGCATTAACAGC	1203347
Query	121	GCGAAGGATGACGCCGGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTTTACTTCTAACATTAAGGC	180
Sbjct	1203348	GCGAAGGATGACGCCGGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTTTACTTCTAACATTAAGGC	1203407
Query	181	CTGACTCAGGCTGCACGTAACGCCAACGACGGTATTTCTGTTGCGCAGACCACCGAAGGC	240
Sbjct	1203408	CTGACTCAGGCTGCACGTAACGCCAACGACGGTATTTCTGTTGCGCAGACCACCGAAGGC	1203467
Query	241	GCGCTGTCCGAAATTAACAACAACCTTACAGCGTATTCGTGAACCTGACGGTTACAGGCTTCT	300
Sbjct	1203468	GCGCTGTCCGAAATTAACAACAACCTTACAGCGTATTCGTGAACCTGACGGTTACAGGCTTCT	1203527
Query	301	ACCGGGACTAACTCTGATTCGGATCTGGACTCCATTAGGACGAAATCAAATCCCGTCTC	360

Sbjct	1203528	ACCGGGACTAACTCTGATTCCGGATCTGGACTCCATTCAGGACGAAATCAAATCCCGTCTC	1203587
Query	361	GACGAAATAGACCCGCTATCCGGTCAGACCCAGTTCAACGGCGTGAACGTACTGGCAAAA	420
Sbjct	1203588	GACGAAATTGACCCGCTATCCGGTCAGACCCAGTTCAACGGCGTGAACGTACTGGCAAAA	1203647
Query	421	GACGGTTCGATGAAAATTCAGGTTGGTGCGAATGACGGCCAGACTATCACTATTGATCTG	480
Sbjct	1203648	GACGGTTCGATGAAAATTCAGGTTGGTGCGAATGACGGCCAGACTATCACTATTGATCTG	1203707
Query	481	AAGAAAATTGACTCTGATACGCTGGGGCTGAATGGTTTTAACGTTAACGGCAAAGGTACT	540
Sbjct	1203708	AAGAAAATTGACTCTGATACGCTGGGGCTGAATGGTTTTAACGTTAACGGCAAAGGTACT	1203767
Query	541	ATTGCGAACAAAGCTGTACAGTCAGCGATCTGACCGCTGCTGGTGCAACGGGAACAGGT	600
Sbjct	1203768	ATTGCGAACAAAGCTGTACAGTCAGCGATCTGACCGCTGCTGGTGCAACGGGAACAGGT	1203827
Query	601	CCTTATGCTGTGACCACAAACAATACAGCTCTCAGCGCTAGCGATGCACTGTCTCGCCTG	660
Sbjct	1203828	CCTTATGCTGTGACCACAAACAATACAGCTCTCAGCGCTAGCGATGCACTGTCTCGCCTG	1203887
Query	661	AAAACCGGAGATACAGTTACTACTACTGGCTCGAGTGCTGCGACCTATACTTATGATGCG	720
Sbjct	1203888	AAAACCGGAGATACAGTTACTACTACTGGCTCGAGTGCTGCGACCTATACTTATGATGCG	1203947
Query	721	GCTAAAGGGAACCTCACCACCTCAAGCAACAGTTGCAGATGGCGATGTTGTTAACTTTGCA	780
Sbjct	1203948	GCTAAAGGGAACCTCACCACCTCAAGCAACAGTTGCAGATGGCGATGTTGTTAACTTTGCA	1204007
Query	781	AATACTCTGAAACCAGCGGCTGGCACTACTGCATCAGGTGTTTATACTCGTAGTACCGGT	840
Sbjct	1204008	AATACTCTGAAACCAGCGGCTGGCACTACTGCATCAGGTGTTTATACTCGTAGTACCGGT	1204067
Query	841	GATGTGAAGTTTGATGTAGATGCTAATGGCGATGTGACCATCGGTGGTAAAGCCGCGTAC	900
Sbjct	1204068	GATGTGAAGTTTGATGTAGATGCTAATGGCGATGTGACCATCGGTGGTAAAGCCGCGTAC	1204127
Query	901	CTGGACGCCACTGGTAACCTATCTACAACAACGCCCGCATTGCATCTTCAGCGAAATTG	960
Sbjct	1204128	CTGGACGCCACTGGTAACCTATCTACAACAACGCCCGCATTGCATCTTCAGCGAAATTG	1204187
Query	961	TCCGATCTGTTTGTAGCGGTAGTACTTTAGCGACAACCTGGTCTATCCAGCTGTCTGGC	1020
Sbjct	1204188	TCCGATCTGTTTGTAGCGGTAGTACTTTAGCGACAACCTGGTCTATCCAGCTGTCTGGC	1204247
Query	1021	ACAACCTATAACTTTGGTGCTGCGGCAACTTCTGGCGTAACCTACACAAAACGGTAAGT	1080
Sbjct	1204248	ACAACCTATAACTTTGGTGCTGCGGCAACTTCTGGCGTAACCTACACAAAACGGTAAGT	1204307
Query	1081	GCTGATACTGTTCTGAGCACAGTACAGAGTGCTGCAACGGCTAACACAGCAGTTACTGGT	1140
Sbjct	1204308	GCTGATACTGTTCTGAGCACAGTACAGAGTGCTGCAACGGCTAACACAGCAGTTACTGGT	1204367
Query	1141	GCGACAATTAAGTATAATACAGGTATTAGTCTGCAACTGCGTCCTTCGGTGGTGCGAAT	1200
Sbjct	1204368	GCGACAATTAAGTATAATACAGGTATTAGTCTGCAACTGCGTCCTTCGGTGGTGCGAAT	1204427
Query	1201	ACTAATGGTGCTGGTAATTCGAATGACACCTATACTGATGCAGACAAAGAGCTCACCACA	1260
Sbjct	1204428	ACTAATGGTGCTGGTAATTCGAATGACACCTATACTGATGCAGACAAAGAGCTCACCACA	1204487
Query	1261	ACCGCATCTTACACTATCAACTACAACGTCGATAAAGGATACCGGTACAGTAACTGTAGCT	1320
Sbjct	1204488	ACCGCATCTTACACTATCAACTACAACGTCGATAAAGGATACCGGTACAGTAACTGTAGCT	1204547
Query	1321	TCAAATGGCGCAGGTGCAACTGGTAAATTTGCAGCTACTGTTGGGGCACAGGCTTATGTT	1380
Sbjct	1204548	TCAAATGGCGCAGGTGCAACTGGTAAATTTGCAGCTACTGTTGGGGCACAGGCTTATGTT	1204607
Query	1381	AACTCTACAGGTAAACTGACCACTGAAACCACCAGTGCAGGCACTGCAACCAAAGATCCT	1440
Sbjct	1204608	AACTCTACAGGTAAACTGACCACTGAAACCACCAGTGCAGGCACTGCAACCAAAGATCCT	1204667

```

Query 1441      CTGGCTGCCCTGGACGACGCTATCAGCTCCATCGACAAAATCCGTTTCATCCCTGGGTGCT 1500
                |||
Sbjct 1204668  CTGGCTGCCCTGGACGACGCTATCAGCTCCATCGACAAAATCCGTTTCATCCCTGGGTGCT 1204727

Query 1501      ATCCAGAACCGTCTGGATTCTGCGGTGACTAACCTGAACAACACCACTACCAACCTGTCT 1560
                |||
Sbjct 1204728  ATCCAGAACCGTCTGGATTCTGCGGTGACTAACCTGAACAACACCACTACCAACCTGTCT 1204787

Query 1561      GAAGCGCAGTCCCGTATTCAGGACGCTGACTATGCGACCGAAGTGTCCAACATGTCGAAA 1620
                |||
Sbjct 1204788  GAAGCGCAGTCCCGTATTCAGGACGCTGACTATGCGACCGAAGTGTCCAACATGTCGAAA 1204847

Query 1621      GCGCAGATTATCCAGCAGGCCGGTAACCTCCGTGCTGGCAAAAGCCAACCAGGTACCGCAG 1680
                |||
Sbjct 1204848  GCGCAGATTATCCAGCAGGCCGGTAACCTCCGTGCTGGCAAAAGCCAACCAGGTACCGCAG 1204907

Query 1681      CAGGTTCTGTCTCTGCTGCAGGGTTAA 1707
                |||
Sbjct 1204908  CAGGTTCTGTCTCTGCTGCAGGGTTAA 1204934

```

[|CP000036.1|](#) D *Shigella boydii* Sb227, complete genome

Features in this part of subject sequence: [flagellin](#)

```

Query 1          ATGGCACAAGTCATTAATACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAAATAATATCAACAAG 60
                |||
Sbjct 1092639  ATGGCACAAGTCATTAATACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAAATAATATCAACAAG 1092698

Query 61         AACCAGTCTGCGTGTTCGAGTTCTATCGAACGCTGTCTTCTGGCTTGCGTATTAACAGC 120
                |||
Sbjct 1092699  AACCAGTCTGCGTGTTCGAGTTCTATCGAACGCTGTCTTCTGGCTTGCGTATTAACAGC 1092758

Query 121        GCGAAGGATGACGCCGCGGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTTTACTTTCTAACATTAAGGC 180
                |||
Sbjct 1092759  GCGAAGGATGACGCCGCGAGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTTTACTTTCTAACATTAAGGC 1092818

Query 181        CTGACTCAGGCTGCACGTAACGCCAACGACGGTATTTCTGTTGCGCAGACCACCGAAGGC 240
                |||
Sbjct 1092819  CTGACTCAGGCGGCCGTAACGCCAACGACGGTATCTCCGTTGCGCAGACCCTGAAGGC 1092878

Query 241        GCGCTGTCCGAAATTAACAACAACCTTACAGCGTATTCTGTAAGTACGAGTTTCAAGGCTCT 300
                |||
Sbjct 1092879  GCGCTGTCCGAAATTAACAACAACCTTACAGCGTATTCTGTAAGTACGAGTTTCAAGGCTCT 1092938

Query 301        ACCGGGACTAACTCTGATTCCGATCTGGACTCCATTCCAGGACGAAATCAAATCCCGTCTC 360
                |||
Sbjct 1092939  ACCGGGACTAACTCCGATCTCGATCTGGACTCCATTCCAGGACGAAATCAAATCCCGTCTC 1092998

Query 361        GACGAAATGACCGCGTATCCGGTCAGACCCAGTTCAACGGCGTGAACGTACTGGCAAAA 420
                |||
Sbjct 1092999  GACGAAATGACCGCGTATCTGCCCAGACCCAGTTCAACGGCGTGAACGTACTGGCGAAA 1093058

Query 421        GACGGTTTCGATGAAAATTCAGGTTGGTGCGAATGACGGCCAGACTATCACTATTGATCTG 480
                |||
Sbjct 1093059  GACGGTTCAATGAAAATTCAGGTTGGTGCGAATGACGGCCAGACTATCACGATTGATCTG 1093118

Query 481        AAGAAAATGACTCTGATACGCTGGGGTGAATGGTTTTAACGTTAACGGCAAAGGACT 540
                |||
Sbjct 1093119  AAGAAAATGACTCAGATACGCTGGGGTGAATGGTTTTAACGTTAACGGCAAAGGACT 1093178

Query 541        ATTGCGAACAAAGCTGCTACAGTCAGCGATCTGACCGCTGCTGGTGCAACGGGAACAGGT 600
                |||
Sbjct 1093179  ATTGCGAACAAAGCTGCTACAGTCAGCGATCTGACCGCTGCTGGTGCAACGGGAACAGGT 1093238

Query 601        CCTTATGCTGTGACCACAAACAATACAGCTCTCAGCGCTAGCGATGCACTGTCTCGCCTG 660
                |||
Sbjct 1093239  CCTTATGCTGTGACCACAAACAATACAGCACTCAGCGCTAGCGATGCACTGTCTCGCCTG 1093298

Query 661        AAAACCGGAGATACAGTTACTACTACTGGCTCGAGTGCTGCGACCTATACTTATGATGCG 720
                |||
Sbjct 1093299  AAAACCGGAGATACAGTTACTACTACTGGCTCGAGTGCTGCGATCTATACTTATGATGCG 1093358

Query 721        GCTAAAGGGAACCTCACCCTCAAGCAACAGTTGCAGATGGCGATGTTGTTAACTTTGCA 780

```

Sbjct	1093359	 GCTAAAGGGAACCTCACCACCTCAAGCAACAGTTGCAGATGGCGATGTTGTTAACTTTGCG	1093418
Query	781	 AATACTCTGAAACCAGCGGCTGGCACTACTGCATCAGGTGTTTATACTCGTAGTACCGGT	840
Sbjct	1093419	 AATACTCTGAAACCAGCGGCTGGCACTACTGCATCAGGTGTTTATACTCGTAGTACTGGT	1093478
Query	841	 GATGTGAAGTTTGATGTAGATGCTAATGGCGATGTGACCATCGGTGGTAAAGCCGCGTAC	900
Sbjct	1093479	 GATGTGAAGTTTGATGTAGATGCTAATGGCGATGTGACCATCGGTGGTAAAGCCGCGTAC	1093538
Query	901	 CTGGACGCCACTGGTAACCTATCTACAACAACGCCGGCATTGCATCTTCAGCGAAATTG	960
Sbjct	1093539	 CTGGACGCCACTGGTAACCTATCTACAACAACGCCGGCATTGCATCTTCAGCGAAATTG	1093598
Query	961	 TCCGATCTGTTTGCTAGCGGTAGTACTTTAGCGACAACCTGGTTCTATCCAGTGTCTGGC	1020
Sbjct	1093599	 TCCGATCTGTTTGCTAGCGGTAGTACTTTAGCGACAACCTGGTTCTATCCAGTGTCTGGC	1093658
Query	1021	 ACAACCTATAACTTTGGTGCTGCGGCAACTTCTGGCGTAACCTACACAAAACGGTAAGT	1080
Sbjct	1093659	 ACAACCTATAACTTTGGTGCTGCGGCAACTTCTGGCGTAACCTACACAAAACGGTAAGT	1093718
Query	1081	 GCTGATACTGTTTCTGAGCACAGTACAGAGTGTGCAACGGCTAACACAGCAGTTACTGGT	1140
Sbjct	1093719	 GCTGATACTGTTTCTGAGCACAGTACAGAGTGTGCAACGGCTAACACAGCAGTTACTGGT	1093778
Query	1141	 GCGACAATTAAGTATAATACAGGTATTCAGTCTGCAACTGCGTCCTTCGGTGGTGCGAAT	1200
Sbjct	1093779	 GCGACAATTAAGTATAATACAGGTATTCAGTCTGCAACGGCGTCCTTCGGTGGTGCGAAT	1093838
Query	1201	 ACTAATGGTGCTGGTAATTCGAATGACACCTATACTGATGCAGACAAAGAGCTCACCACA	1260
Sbjct	1093839	 ACTAATGGTGCTGGTAATTCGAATGACACCTATACTGATGCAGACAAAGAGCTCACCACA	1093898
Query	1261	 ACCGCATCTTACACTATCAACTACAACGTCGATAAGGATACCGGTACAGTAACTGTAGCT	1320
Sbjct	1093899	 ACCGCATCTTACACTATCAACTACAACGTCGATAAGGATACCGGTACAGTAACTGTAGCT	1093958
Query	1321	 TCAAATGGCGCAGGTGCAACTGGTAAATTTGCAGCTACTGTTGGGGCACAGGCTTATGTT	1380
Sbjct	1093959	 TCAAATGGCGCAGGTGCAACTGGTAAATTTGCAGCTACTGTTGGGGCACAGGCTTATGTT	1094018
Query	1381	 AACTCTACAGGTAACCTGACCACTGAAACCACAGTGCAGGCACTGCAACCAAAGATCCT	1440
Sbjct	1094019	 AACTCTACAGGTAACCTGACCACTGAAACCACAGTGCAGGCACTGCAACCAAAGATCCT	1094078
Query	1441	 CTGGCTGCCCTGGACGACGCTATCAGCTCCATCGACAAAATCCGTTTCATCCCTGGGTGCT	1500
Sbjct	1094079	 CTGGCTGCCCTGGATGAAGCTATCAGCTCCATCGACAAAATCCGTTTCATCCCTGGGTGCT	1094138
Query	1501	 ATCCAGAACCGTCTGGATTCTGCGGTGACTAACCTGAACAACACCACTACCAACCTGTCT	1560
Sbjct	1094139	 ATCCAGAACCGTCTGGATTCTGCGGTGACTAACCTGAACAACACCACTACCAACCTGTCT	1094198
Query	1561	 GAAGCGCAGTCCCGTATTCAGGACGCTGACTATGCGACCGAAGTGTCCAACATGTCGAAA	1620
Sbjct	1094199	 GAAGCGCAGTCCCGTATTCAGGACGCTGACTATGCGACCGAAGTGTCCAACATGTCGAAA	1094258
Query	1621	 GCGCAGATTATCCAGCAGGCCGGTAACTCCGTGCTGGCAAAAGCCAACCAAGGTACCGCAG	1680
Sbjct	1094259	 GCGCAGATCATCCAGCAGGCCGGTAACTCCGTGCTGGCAAAAGCCAACCAAGGTACCGCAG	1094318
Query	1681	 CAGGTTCTGTCTCTGCTGCAGGGTTAA	1707
Sbjct	1094319	 CAGGTTCTGTCTCTGCTGCAGGGTTAA	1094345

## Sequência de aminoácidos: frame +1

Met A Q V I N T N S L S L I T Q N N I N K N Q S A L S S S I E R L S S G L R I N S A K D D A A G Q  
A I A N R F T S N I K G L T Q A A R N A N D G I S V A Q T T E G A L S E I N N N L Q R I R E L T V  
Q A S T G T N S D S D L D S I Q D E I K S R L D E I D R V S G Q T Q F N G V N V L A K D G S Met K

I Q V G A N D G Q T I T I D L K K I D S D T L G L N G F N V N G K G T I A N K A A T V S D L T A A  
G A T G T G P Y A V T T N N T A L S A S D A L S R L K T G D T V T T T G S S A A T Y T Y D A A K G  
N F T T Q A T V A D G D V V N F A N T L K P A A G T T A S G V Y T R S T G D V K F D V D A N G D V  
T I G G K A A Y L D A T G N L S T N N A G I A S S A K L S D L F A S G S T L A T T G S I Q L S G T  
T Y N F G A A A T S G V T Y T K T V S A D T V L S T V Q S A A T A N T A V T G A T I K Y N T G I Q  
S A T A S F G G A N T N G A G N S N D T Y T D A D K E L T T T A S Y T I N Y N V D K D T G T V T V  
A S N G A G A T G K F A A T V G A Q A Y V N S T G K L T T E T T S A G T A T K D P L A A L D D A I  
S S I D K F R S S L G A I Q N R L D S A V T N L N N T T T N L S E A Q S R I Q D A D Y A T E V S N  
**Met** S K A Q I I Q Q A G N S V L A K A N Q V P Q Q V L S L L Q G **Stop**

As amostras de *E.coli* 7C, 12C, 15C, 18C, 19C, 26C, 34C, 35C, 36C, 37C, 38C e 39C HNT não apresentaram gene *fliC* PCR-RFLP característico e não foi possível caracterizá-las por sequenciamento, não demonstrando características de genes já descritos ou um gene novo. Para algumas delas não foi possível obter sequências gênicas confiáveis.

**Tabela 8: Amostras de *E. coli* caracterizadas por PCR-RFLP e sequenciamento de *fliC*.**

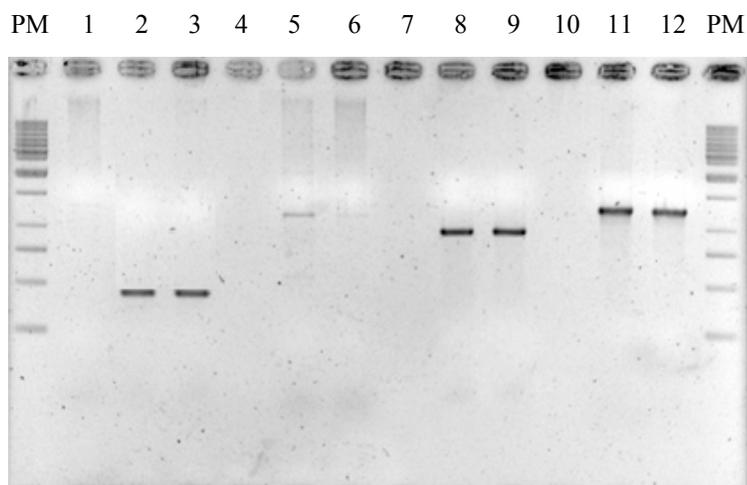
Amostra	Perfil Molecular	Análise de Sequenciamento	Sorologia convencional	Perfil característico
1C	P13 (H16)	-	NR*	<b>H16</b>
2C	P13 (H16)	-	NR	<b>H16</b>
3C	-	H2	NR	<b>H2'</b>
4C	-	<i>fliC</i> novo	H48/H54	<b>novo</b>
5C	P28 (H34)	-	NR	<b>H34</b>
6C	P28 (H34)	-	NR	<b>H34</b>
8C	P28 (H34)	-	NR	<b>H34</b>
13C	-	H25	H38/ H51	<b>H25</b>
14C	-	H25	H37/ H48/ H38	<b>H25</b>
16C	P2 (H2)	-	NR	<b>H2</b>
17C	P2 (H2)	-	H38/H48	<b>H2</b>
20C	P32 (H44)	-	NR	<b>H44</b>
21C	-	H7	NR	<b>H7</b>
22C	-	H7	NR	<b>H7</b>
27C	P27 (H33)	-	H33/H53	<b>H33</b>
32C	-	H32	NR	<b>H32</b>
40C	-	<i>fliC</i> novo	NR	<b>novo</b>

\* NR: Não houve reação positiva em sorologia.

## 5. PCR para detecção dos genes de variação de fase em *E. coli* HNT e amostras de *E.coli* H padrão

Para os iniciadores FljA, FlkA53 e flmA54 a temperatura estabelecida foi de 55°C. Já para o iniciador FlkA3 não obtivemos bons resultados quanto ao anelamento, contudo a amostra H3

amplificou o produto esperado utilizando iniciador FlkA53. Os iniciadores geraram produtos de 423pb (FljA), 1072pb (FlkA3), 933pb (FlkA53) e 1230pb (FlmA54). Tais produtos já eram esperados e vale ressaltar que houve reações negativas quando os iniciadores foram testados cruzadamente. Os produtos das reações estão ilustrados na Figura H, abaixo.



**Figura H:** Perfil eletroforético da PCR dos genes de variação de fase em amostras de *E.coli* H padrão. PM: padrão de peso molecular 1Kb (Fermentas). 1: amostra H3 FljA negativo; 2: amostra H53 + FljA; 3: amostra H54 + FljA; 5/6: amostra H3 com iniciador FlkA3; 8/9: amostra H53 com iniciador FlkA53; 11/12: amostra H54 com iniciador FlmA 54.

As amostras padrão H53 e H54 foram positivas para as reações de PCR utilizando os iniciadores FlkA53 e FlmA54, respectivamente. Ambas as amostras amplificaram para o gene repressor *fljA*. Nos ensaios de PCR onde foram utilizadas todas as amostras H de *E.coli* padrão observou-se que as amostras H35 e H47 foram positivas para os iniciadores FljA e FlmA54, já as amostras H11 e H40 foram positivas apenas para FlmA54. Nenhuma amostra de *E.coli* H padrão, com exceção da amostra H53, apresentou reação positiva para o gene FlkA53.

Todas as amostras de *E. coli* HNT foram submetidas a PCR utilizando os iniciadores FljA, FlkA53 e FlmA54. As amostras HNT 3C e 4C apresentaram FljA e FlmA54, enquanto que as

amostras 15C, 16C, 17C, 18C, 19C, 37C e 38C foram positivas para FlmA54. Nenhuma das amostras HNT apresentou reação positiva com o iniciador Flk53.

## 6. Sequenciamento dos genes relacionados à variação de fase flagelar em *E. coli* HNT e amostras padrão

As amostras p de *E.coli* padrão H35, H53 e H54 tiveram o gene *fljA* seqüenciado e quando analisados pelo sistema BLAST apresentaram 99% de similaridade com as seqüências das amostras padrão depositadas no GenBank (AB128916, AB128917 e AB128918), correspondendo às amostras H3, H53 e H54, respectivamente). Para *E. coli* HNT 3C e 4C, o resultado das comparações gênicas indicou uma grande semelhança com o repressor *fljA* de *Salmonella enterica*. As seqüências de *fljA* das amostras H35, H53, H54, 3C e 4C analisadas estão descritas abaixo.

### Amostra de *E.coli* H35 – gene *fljA*:

**Depósito no GenBank: GQ456042**

LOCUS GQ456042 527 bp DNA linear BCT 20-JAN-2010  
DEFINITION Escherichia coli strain O134:H35 FljA (fljA) gene, complete cds.  
ACCESSION GQ456042  
VERSION GQ456042.1 GI:283982450  
KEYWORDS .  
SOURCE Escherichia coli  
ORGANISM Escherichia coli  
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;  
Enterobacteriaceae; Escherichia.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 527)  
AUTHORS Moura,C., Tiba,M.R. and Leite,D.S.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (04-AUG-2009) Microbiologia e Imunologia, Unicamp, Brasil  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..527  
/organism="Escherichia coli"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/strain="O134:H35"  
/db\_xref="taxon:562"  
gene complement(1..525)  
/gene="fljA"  
CDS complement(1..525)  
/gene="fljA"  
/codon\_start=1  
/transl\_table=11  
/product="FljA"  
/protein\_id="ADB56972.1"  
/db\_xref="GI:283982451"  
/translation="MNDISYGREAEKWPREYSMLARRIQFLRFNDYPVKLVSGNGQSI  
IGYISKFNQKENMILASDEAKGSNRIEVKLEFLASLEELPISENLTARLIAADVFNVQ  
PCDPTRKDFFSICNKCFKQGVGKIVHMLDGRILLIGETGVNACQVGI IRPNGNHMQIM  
FDWVSRITSSDYS D"

ORIGIN

```

1 ttaatcagag taatctgagg aggttattct gctaaccag tcaaacatga tctgcatatg
61 gttgccatta ggtctaatta ttccaacctg acaagcatta acgccagttg tttccccaat
121 cagaatgcgc ccatctaaca tgtgtacttt tatacccact ccttgtttga aacacttatt
181 gcagatagaa aaaaagtctt tccttggttg gtcacatggc tgaacattaa aaacatcagc
241 agcaataagt cttgcagtta aattttcgct aatcggaat tcttcgagtg atgcgagaaa
301 ctcaagtttt acctcaatcc tattgcttcc cttagcttca tcagatgcca agatcatatt
361 ttctttctgg ttaaactttg aaatataacc aattattgat tgcccattgc cacttaccag
421 cttcactgga taatcattaa agcgtagaaa ttgtatcctg cgagcaagca tagaatattc
481 acggggccat ttttcgctt ctcgaccata tgagatatca ttcataa

```

**Amostra de *E.coli* H53 – gene *fljA*:**

**Depósito no GenBank: GQ456043**

```

LOCUS      GQ456043                525 bp    DNA        linear    BCT 20-JAN-2010
DEFINITION Escherichia coli strain O148:H53 FljA (fljA) gene, complete cds.
ACCESSION  GQ456043
VERSION    GQ456043.1  GI:283982452
KEYWORDS   .
SOURCE     Escherichia coli
  ORGANISM Escherichia coli
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
            Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE  1 (bases 1 to 525)
  AUTHORS  Moura,C., Tiba,M.R. and Leite,D.S.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (04-AUG-2009) Microbiologia e Imunologia, Unicamp, Brasil
FEATURES   Location/Qualifiers
  source   1..525
            /organism="Escherichia coli"
            /mol_type="genomic DNA"
            /strain="O148:H53"
            /db_xref="taxon:562"
  gene     complement(1..525)
            /gene="fljA"
  CDS     complement(1..525)
            /gene="fljA"
            /note="repressor of fliC"
            /codon_start=1
            /transl_table=11
            /product="FljA"
            /protein_id="ADB56973.1"
            /db_xref="GI:283982453"
            /translation="MNDISYGREAEKWPREYSMLARRIQILRFNDYPVKLVSGNQSI
            IGYISKFNQKENMILASDEAKGSNRIEVKLEFLASLEELPVGENLTTRLIAADVFNVQ
            PCDPTRKDFFSICNKCFKQGVGIKVHMLDGRILIGETTVGNACQVGMIRPNGNHMQIM
            FDWVSRTSSDYSYD"

```

ORIGIN

```

1 ttaatcagag taatctgaag aggttattct gctaaccag tcaaacatga tctgcatatg
61 gttgccatta ggtctaataca ttccaacttg acaagcatta acaccagttg tttccctat
121 cagaatgcgc ccatctagca tatgtacttt tatacccacc ccttgtttga aacacttatt
181 gcagatagag aaaaagtctt tccttggttg atcacatggc tgaacattaa aaacatcagc
241 agcaataagt cttgtggtta aattttcgcc aaccgtaat tcttcgagtg atgcgagaaa
301 ctcaagtttt acctcaatcc tattgcttcc cttagcttca tcagatgcca agatcatatt
361 ttctttctgg ttaaactttg aaatataacc aattattgat tgtccattgc cacttaccag
421 cttcactgga taatcattga atcgtagaat ttgtatcctt cgagcaagca tagaatattc
481 acggggccat ttttcgctt ctcgaccata tgagatatca ttcataa

```

**Amostra de *E.coli* H54 – gene *fljA*:**

**Depósito no GenBank: GQ456044**

```

LOCUS      GQ456043                525 bp    DNA        linear    BCT 20-JAN-2010
DEFINITION Escherichia coli strain O148:H53 FljA (fljA) gene, complete cds.
ACCESSION  GQ456043
VERSION    GQ456043.1  GI:283982452
KEYWORDS   .

```

SOURCE Escherichia coli  
 ORGANISM Escherichia coli  
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;  
 Enterobacteriaceae; Escherichia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 525)  
 AUTHORS Moura,C., Tiba,M.R. and Leite,D.S.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (04-AUG-2009) Microbiologia e Imunologia, Unicamp, Brasil

FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..525  
 /organism="Escherichia coli"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="O148:H53"  
 /db\_xref="taxon:562"  
gene complement(1..525)  
 /gene="fljA"  
CDS complement(1..525)  
 /gene="fljA"  
 /note="repressor of fliC"  
 /codon\_start=1  
 /transl\_table=11  
 /product="FljA"  
 /protein\_id="ADB56973.1"  
 /db\_xref="GI:283982453"  
 /translation="MNDISYGREAEKWPREYSMLARRIQILRFNDYPVKLVSGNGQSI  
 IGYISKFNQKENMILASDEAKGSNRIEVKLEFLASLEELPVGENLTTRLIAADVFNVQ  
 PCDPTRKDFFSICNKCFKQGVGIKVHMLDGRILLIGETGVNACQVGMIRPNHMQIM  
 FDWVSRITSSDYSD"

ORIGIN  
 1 ttaatcagag taatctgaag aggttattct gctaaccag tcaaacatga tctgcatatg  
 61 gttgccatta ggtcctaaca ttccaacttg acaagcatta acaccagttg tttcccctat  
 121 cagaatgcgc ccatctagca tatgtacttt tatacccacc ccttggttga aacacttatt  
 181 gcagatagag aaaaagtctt tccttggttg atcacatggc tgaacattaa aaacatcagc  
 241 agcaataagt cttgtgggta aattttcgcc aaccggtaat tcttcgagtg atgcgagaaa  
 301 ctcaagtttt acctcaatcc tattgcttcc cttagcttca tcagatgcca agatcatatt  
 361 ttctttctgg ttaaactttg aatatataacc aattattgat tgtccattgc cacttaccag  
 421 cttcactgga taatcatgga atcgtagaat ttgtatcctt cgagcaagca tagaatatc  
 481 acggggccat ttttcgctt ctcgaccata tgagatatca ttcatt

### Amostra de *E.coli* 3C – gene *fljA*:

#### Depósito no GenBank: GQ456045

LOCUS GQ456045 539 bp DNA linear BCT 20-JAN-2010  
 DEFINITION Escherichia coli strain FV4755.3C FljA (fljA) gene, complete cds.  
 ACCESSION GQ456045  
 VERSION GQ456045.1 GI:283982456  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Escherichia coli  
 ORGANISM Escherichia coli  
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;  
 Enterobacteriaceae; Escherichia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 539)  
 AUTHORS Moura,C., Tiba,M.R. and Leite,D.S.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (04-AUG-2009) Microbiologia e Imunologia, Unicamp, Brasil

FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..539  
 /organism="Escherichia coli"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="FV4755.3C"  
 /db\_xref="taxon:562"  
gene 15..539  
 /gene="fljA"  
CDS 15..539  
 /gene="fljA"  
 /note="repressor of fliC"  
 /codon\_start=1  
 /transl\_table=11  
 /product="FljA"

```

/protein_id="ADB56975.1"
/db_xref="GI:283982457"
/translation="MNDISYGREAEKWPQYSMLARRIQFLRFNDYPVKLVSSSGQSI
IGYISKFNQKENVILASDEAKGCNRIEVKLEFLASLEELPIGENLTARLIAADVFNQV
PCDPTRKDDFFSICNKCFKQGVGIVHMLDGRILIGETTGVNACQVGMIRPNGNHMQIM
FDWVSRITSSDYSG"

```

ORIGIN

```

1 taggtacaac tgttatgaat gatatctcat atggctcgaga agcggaaaaa tggcccgatc
61 aatattctat gcttgctcgc aggatacaat ttctacgctt caatgactat ccagtgaagt
121 tgtaagcagc agcggggcaa tcaataattg gttacatttc aaagttaac cagaaagaaa
181 atgtaatttt ggcattctgat gaggctaagg gatgcaatcg aattgaagta aaacttgagt
241 ttctcgcac actcgaagaa ttaccgattg gcgaaaattt aaccgcaaga cttattgctg
301 ctgatgtttt taatgttcag ccatgtgacc caacaaggaa agactttttc tctatctgca
361 ataagtgttt taacaagggt gtgggtataa aagtaacat gctagatggg cgtattctga
421 taggggaaac acaggcgctt aatgcttgtc aagtcggaat gattagacct aatggcaacc
481 atatgcagat catgtttgac tgggttagca gaataacctc ctcagattac tctggttaa

```

**Amostra de *E.coli* 4C – gene *fljA*:**

**Depósito no GenBank: GQ456046**

```

LOCUS       GQ456046                538 bp    DNA     linear   BCT 20-JAN-2010
DEFINITION Escherichia coli strain FV2418.4C FljA (fljA) gene, complete cds.
ACCESSION   GQ456046
VERSION     GQ456046.1  GI:283982458
KEYWORDS    .
SOURCE      Escherichia coli
  ORGANISM  Escherichia coli
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
            Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE   1 (bases 1 to 538)
  AUTHORS   Moura,C., Tiba,M.R. and Leite,D.S.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (04-AUG-2009) Microbiologia e Imunologia, Unicamp, Brasil
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..538
                    /organism="Escherichia coli"
                    /mol_type="genomic DNA"
                    /strain="FV2418.4C"
                    /db_xref="taxon:562"
     gene            14..538
                    /gene="fljA"
     CDS             14..538
                    /gene="fljA"
                    /note="repressor of fliC"
                    /codon_start=1
                    /transl_table=11
                    /product="FljA"
                    /protein_id="ADB56976.1"
                    /db_xref="GI:283982459"
                    /translation="MNDISYGREAEKWPREYSMLARRIQFLRFNDYPVKLVSSSGQSI
                    IGYISKFNQKENVILASDEAKGCNRIEVKLEFLASLEELPIGENLTARLIAADVFNQV
                    PCDPTRKDDFFSICNKCFKQGVGIVHMLDGRILIGETTGVNACQVGMIRPNGNHMRIM
                    FDWVSRITSSDYSG"

```

ORIGIN

```

1 aggtacaact gttatgaatg atatctcata tggctcgagaa gcggaaaaat ggccccgaga
61 atattctatg cttgctcgcg ggatacaatt tctacgcttc aatgactatc cagtgaagtt
121 ggtaagcagc agcggggcaat caataatcgg ttacatttca aagttaacc agaagaaaaa
181 tgtaattttg gcatctgatg aggctaaggg atgcaatcga attgaagtaa aacttgagtt
241 tctcgcacat ctggaagaat taccgattgg cgaaaattta accgcaagac ttattgctgc
301 tgatgttttt aatgttcagc catgtgaccc aacaaggaaa gactttttct ctatctgcaa
361 taagtgtttt aaacaagggg tgggtataaa agtaacatg ctagatgggc gtattctgat
421 aggggaaaca acaggcgctt atgcttgcca agtcggaatg attagacctc atggcaacca
481 tatgcggatc atgtttgact gggttagcag aataacctcc tcagattact ctggttaa

```

Em relação aos genes *flkA53* e *flmA54* (produtores de flagelina H53 e H54), o resultado do sequenciamento mostrou 100% de similaridade, no sistema BLAST, com as sequências de *flkA53* e *flmA54* depositadas (AB128917 e AB128918, respectivamente). O gene *flkA* e *flmA* das amostras padrão de *E.coli* H53 e H54 foram sequenciados parcialmente, por se tratar apenas da confirmação do gene.

### Amostra de *E.coli* H54 – gene *flmA*:

#### Sequência protéica parcial:

```
dbj|BAD14977.1| flagellin [Escherichia coli]
Length=516

Score = 667 bits (1721), Expect = 0.0
Identities = 369/369 (100%), Positives = 369/369 (100%), Gaps = 0/369 (0%)
Frame = +3

Query 3      LQRVRELTVQATNGTNSDSLSSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLASKNTLTIQV 182
Sbjct 89      LQRVRELTVQATNGTNSDSLSSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLASKNTLTIQV 148

Query 183     GANDGETIDINLKEINSQTLGLDKLVQKAYTPSGENVKVDtttYtttYtDGTAIKNKA 362
Sbjct 149     GANDGETIDINLKEINSQTLGLDKLVQKAYTPSGENVKVDTTTTTTTTYTDGTAIKNKA 208

Query 363     LATDVNNASSIGVSDAIPGDIKFNETSCKYVVAITSTEHNKNGDYEITVDKDGSAALVA 542
Sbjct 209     LATDVNNASSIGVSDAIPGDIKFNETSCKYVVAITSTEHNKNGDYEITVDKDGSAALVA 268

Query 543     GQSSPKSLEDVGATKNVTAYQVANTQSNTQSV DATVSAGAI SELKTGGVDNTAAGNAKLV 722
Sbjct 269     GQSSPKSLEDVGATKNVTAYQVANTQSNTQSV DATVSAGAI SELKTGGVDNTAAGNAKLV 328

Query 723     KMTYTDSNGKKVEGGYALKVGDDYYAADYESTsktvtvrttsYKDVDGVPQKGLNKIGGA 902
Sbjct 329     KMTYTDSNGKKVEGGYALKVGDDYYAADYESTsktvtvrttsYKDVDGVPQKGLNKIGGA 388

Query 903     DGKTEVTVIGEKTYAADKLDHDFSKQATLGE EATTTVNPLDAIDKALAQVDSLRS DLG 1082
Sbjct 389     DGKTEVTVIGEKTYAADKLDHDFSKQATLGE EATTTVNPLDAIDKALAQVDSLRS DLG 448

Query 1083    AVQNRFDST 1109
Sbjct 449    AVQNRFDST 457
```

### Amostra de *E.coli* H53 – gene *flkA*:

#### Sequência protéica parcial:

```
dbj|BAD14967.1| flagellin [Escherichia coli]
Length=423

Score = 516 bits (1329), Expect = 1e-144
Identities = 267/267 (100%), Positives = 267/267 (100%), Gaps = 0/267 (0%)
Frame = -1
```

Query	834	NGTNSDSVQSIQEEIQORLAEIDRVSGQTQFNGVKVLTSDSKLSIQVGANDGEKIDIDL	655
Sbjct	101	NGTNSDSVQSIQEEIQORLAEIDRVSGQTQFNGVKVLTSDSKLSIQVGANDGEKIDIDL	160
Query	654	KKIDTGTGLGLANFSVDSKFDSTSTKTVANGGDIVLSSKTIKAEIQIDSHSADPKAADGLY	475
Sbjct	161	KKIDTGTGLGLANFSVDSKFDSTSTKTVANGGDIVLSSKTIKAEIQIDSHSADPKAADGLY	220
Query	474	ALKDGTGYAVKDKDGAYHAAVKNADGKVTWDSSDTSVTATDQTTKVTEFQEVYKVVAA	295
Sbjct	221	ALKDGTGYAVKDKDGAYHAAVKNADGKVTWDSSDTSVTATDQTTKVTEFQEVYKVVAA	280
Query	294	NTSGLAANQTFKSYKKNDELGYVVENADGTFNRRANVDSKTVVSVGTIKISTSPDLVATI	115
Sbjct	281	NTSGLAANQTFKSYKKNDELGYVVENADGTFNRRANVDSKTVVSVGTIKISTSPDLVATI	340
Query	114	DNALKIVDSQRSSLGAIQNRFD SAITN 34	
Sbjct	341	DNALKIVDSQRSSLGAIQNRFD SAITN 367	

**Amostra 4C – gene *flmA*:** A amostra 4C, positiva para *flmA*, mostrou 100% de similaridade com o gene *flmA54* quando sequenciados integralmente. Já para amostra 3C não foi possível obter um resultado positivo de sequenciamento de *flmA*.

### Sequência protéica:

dbj|BAD14977.1| flagellin [Escherichia coli]  
Length=516

Score = 843 bits (2177), Expect = 0.0  
Identities = 482/482 (100%), Positives = 482/482 (100%), Gaps = 0/482 (0%)  
Frame = +3

Query	159	GLRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISVAQTTEGALSEINNNLQRVRE	338
Sbjct	35	GLRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISVAQTTEGALSEINNNLQRVRE	94
Query	339	LTVQATNGTNSDSDLSSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLASKNTLTIQVGANDGE	518
Sbjct	95	LTVQATNGTNSDSDLSSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLASKNTLTIQVGANDGE	154
Query	519	TIDINLKEINSQTLGLDKLVQKAYTPSGENVKVDtTTYtTYTDGTAIKNKAALATDVN	698
Sbjct	155	TIDINLKEINSQTLGLDKLVQKAYTPSGENVKVDTTTTTTTTYTDGTAIKNKAALATDVN	214
Query	699	NASSIGVSDAIPGDIKFNETSGKYVVAITSTEHNKNGDYEITVDKDGSAALVAGQSSPK	878
Sbjct	215	NASSIGVSDAIPGDIKFNETSGKYVVAITSTEHNKNGDYEITVDKDGSAALVAGQSSPK	274
Query	879	SLEDVGATKNVTAYQVANTQSNTQSV DATVSAGAI SELKTGGVDNTAAGNAKLVKMTYTD	1058
Sbjct	275	SLEDVGATKNVTAYQVANTQSNTQSV DATVSAGAI SELKTGGVDNTAAGNAKLVKMTYTD	334
Query	1059	SNGKKVEGGYALKVGGDYAADYEstsktvtvrttsYKVDVGVPPQKGLNKIGGADGKTET	1238
Sbjct	335	SNGKKVEGGYALKVGGDYAADYESTSKTTVRRTTSYKVDVGVPPQKGLNKIGGADGKTET	394
Query	1239	VTIGEKTAAADKLDHDFSKQATLGE EATTTVNPLDAIDKALAQVDSLRS DLGAVQNR	1418
Sbjct	395	VTIGEKTAAADKLDHDFSKQATLGE EATTTVNPLDAIDKALAQVDSLRS DLGAVQNR	454
Query	1419	DstitnlgntlnnlssARSRIEDADYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQTTQNVLSL	1598
Sbjct	455	DSTITNLGNTLNNLSSARSRIEDADYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQTTQNVLSL	514

Query 1599 LR 1604  
LR  
Sbjct 515 LR 516

## 7. Indução da variação de fase

As amostras de *E.coli* H54 e as amostras de *E.coli* de campo 3C e 4C (HNT) positivas para os genes *fliC*, *fljA* e *flmA* e a amostra padrão H48, negativa para os genes de variação de fase, foram submetidas a testes de expressão de variação de fase flagelar. Os resultados estão apresentados na Tabela 9. Foram acrescentados aos meios de cultura os soros anti-H54 e anti-H48, pois a amostra 4C apresentou reação cruzada nos ensaios sorológicos com estes antissoros. A amostra 3C manteve-se móvel quando cultivada com ambos antissoros. Deste cultivo, foi produzido antígeno H e a amostra foi testada novamente com os antissoros padrão. Porém continuou apresentando o perfil HNT no teste de sorologia.

Já a amostra 4C apresentou motilidade quando cultivada com os antissoros anti-H48 e anti-H54, demonstrando variação de fase. Quando ao meio foi acrescentado dois antissoros (anti-H48 e anti-H54) a amostra continuou móvel, porém, com fenótipo HNT. Os antígenos obtidos com a amostra 3C e 4C cultivadas com antissoros foram inoculadas em coelhos a fim de se obter antissoros.

**Tabela 9: Sorologia das amostra de *E. coli* HNT submetidas à de variação de fase flagelar.**

Amostra	Meio de cultura sem soro	Meio de cultura com soro anti-H54 (1:3000)	Meio de cultura com soro anti-H48 (1:3000)	Meio de cultura com soro anti-H48 e anti-H54
H54	H54 (1:5120)	Imóvel	H54 (1:5120)	Imóvel
H48	H48 (1:10240)	H48 (1:10240)	Imóvel	Imóvel
3C	HNT*	HNT	HNT	HNT
4C	H54(1:5120); H48 (1:5120)	H48 (1:5120)	H54 (1:2560)	HNT

\*Não houve reação positiva .

## **8. Produção de antissoros das amostras de *E. coli* HNT não caracterizadas por metodologia molecular**

Os antígenos das amostras de *E.coli* HNT que apresentaram perfis de restrição semelhantes àqueles encontrados nas amostras padrão ou foram caracterizadas por sequenciamento a partir do gene *fliC*, foram titulados contra os respectivos antissoros correspondentes ao antígeno flagelar padrão. As amostras que não foram caracterizadas por metodologia molecular, ou que apresentaram perfil diferente para os mesmo genes depositados no GeneBank (NCBI website database) foram selecionados para produção de antissoros. Foram selecionadas as amostras de *E.coli* HNT 3C, 4C, 29C, 33C e 40C para produção de antissoros.

Os antissoros produzidos com as amostras de *E.coli* HNT foram inicialmente titulados frente aos seus respectivos antígenos homólogos. Posteriormente, os mesmos antissoros foram titulados frente aos 53 antígenos flagelares padrão. Os resultados estão descritos na Tabela 10.

Foram obtidos antissoros com as amostras 29C, 33C, 40C, 3C (cultivadas com soro anti-H54) e com a amostra 4C (cultivada com soros anti-H48 e anti-H54). Após os experimentos de produção de antissoros, coleta do sangue e o processamento dos materiais, os antissoros foram titulados. Os títulos dos soros são mostrados na Tabela 12. Alguns antissoros produzidos reconheceram antígenos H padrão existentes, porém, em títulos mais baixos do que os obtidos com o soro homólogo. Nenhum antígeno HNT utilizado nas inoculações foi reconhecido pelos antissoros H padrão já existentes.

Os antissoros produzidos com as amostras de *E.coli* HNT foram inicialmente titulados frente aos seus respectivos antígenos homólogos. Todos os antissoros reconheceram seu antígeno homólogo em título maior que 1:5000 (Tabela 10). Posteriormente, os antissoros foram titulados frente aos 53 antígenos flagelares padrão. Apesar dos antígenos das amostras HNT terem reagido com alguns antissoros padrões, os antissoros das *E.coli* HNT foram absorvidos e retitulados para

retirar a reação inespecífica. (Tabela 11). O antígeno 3C foi reconhecido pelo antissoro anti-4C, bem como o antígeno 4C foi reconhecido pelo antissoro anti-3C, porém, em títulos abaixo dos títulos com seus antígenos homólogos. Após a reação de absorção, os antígenos foram reconhecidos pelos antissoros cruzadamente em título <1:320. Resultado semelhante foi observado quando da absorção do antissoro anti-4C que reconheceu o antígeno padrão H28. Após a absorção, o título do antissoro frente ao antígeno foi menor que <1:20.

Após os experimentos para validação dos antissoros produzidos foram realizados novamente os experimentos de indução de fase e fase reversão. A amostra 3C cultivada com os antissoros anti-H48 e anti-H54 continuou móvel e com fenótipo HNT. Quando cultivada com o antissoro anti-3C ela apresentou o fenótipo imóvel, não variando a fase flagelar.

**Tabela 10: Títulos dos antissoros produzidos para *E. coli* HNT frente aos antígenos H padrão e antígenos de *E.coli* HNT.**

Antígenos	Antissoros				
	3C+ anti-H54	4C+anti-H48/54	29C	33C	40C
3C+antiH54	1: 10240	1:1280	<1:20	<1:20	<1:20
4C+antiH48/54	1:2560	1:20480	<1:20	1:320	<1:20
29C	<1:20	<1:20	1:10240	<1:20	<1:20
33C	1:80	1:160	<1:20	1:10240	1:640
40C	1:320	1:80	1:640	1:160	1:20480
H14	-	1:80	-	-	-
H28	1:640	1:1280	-	1:160	1:640
H31	-	-	-	1: 80	1:320
H42	1:80	1:320	-	-	1:320
H54	1:80	1:40	-	-	1:160
H55	-	-	-	-	1:640

**Tabela 11. Títulos dos antissoros produzidos para *E. coli* HNT frente aos antígenos H padrão e antígenos de *E.coli* HNT após reação de absorção.**

Antígenos	Antissoros				
	3C+ anti-H54	4C+anti-H48/54	29C	33C	40C
3C+antiH54	1: 10240	1:320	<1:20	<1:20	<1:20
4C+antiH48/54	1:320	1:20480	<1:20	<1:20	<1:20
29C	<1:20	<1:20	1:10240	<1:20	<1:20
33C	<1:20	<1:20	<1:20	1:10240	<1:20
40C	<1:20	<1:20	<1:20	1:160	1:20480
H14	-	<1:20	-	-	-
H28	<1:20	<1:20	-	<1:20	<1:20
H31	-	-	-	<1:20	<1:20
H42	<1:20	<1:20	-	-	<1:20
H54	<1:20	<1:20	-	-	<1:20
H55	-	-	-	-	<1:20

### 8.1. Indução da variação de fase com antissoros contra os antígenos H de *E.coli* HNT.

Destaca-se a amostra 4C que quando cultivada com antissoro anti-H48 apresentou o fenótipo H54/HNT. Quando cultivada com antissoro anti-H54, o fenótipo mudou, se apresentando H48/HNT. Quando cultivada em meio de cultura semi-sólido acrescido dos dois antissoros (anti-H48 e anti-H54), o antígeno não foi tipado, considerado HNT. Após a obtenção do antissoro anti-4C, cultivamos a amostra em duas situações: com meio semi-sólido acrescido do antissoro anti-4C e outro meio com antissoros anti-H48, anti-H54 e anti-4C. Na primeira cultura, o fenótipo da amostra passou a H48/H54. Para constatação, quando cultivada com os três antissoros, a amostra, por fim, foi imobilizada.

A amostra 4C apresentou não apenas um e sim mais de dois genes para expressão de flagelina que operam simultaneamente. Na Tabela 12 podem ser observados os resultados da sorologia da amostra 4C no ensaio de indução da variação de fase flagelar.

**Tabela 12: Cultivo da amostra de *E. coli* HNT 4C para verificar a expressão da variação de fase flagelar.**

Sorologia	Condição de cultivo				
	sem soro	anti-H48	anti-H54	anti-H48 + anti-H54	anti-H48 + anti-H54 + anti-4C
Anti-H48	1:5120	NR*	1:5120	NR	Imóvel
Anti-H54	1:5120	1:2560	NR	NR	Imóvel
Anti-H 4C	1:10240	1:10240	1:10240	1:20480	Imóvel

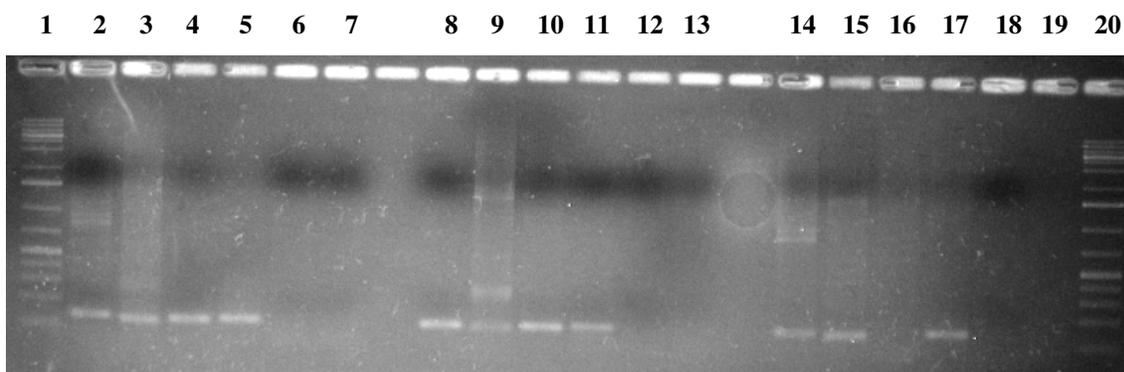
\*NR: sem reação positiva

### 9. Detecção do RNAm dos genes *fliC*, *fljA* e *flmA* através de RT-PCR

Para confirmar a variação de fase flagelar na amostra 4C, utilizou-se das culturas com diferentes antissoros (item 8 Material e Métodos) para extração de RNAm e detecção do cDNA dos genes em diferentes situações. Os resultados estão descritos na Tabela 13 e Figura I. Verificou-se que a amostra 3C não apresentou variação de fase positiva, pois não foi possível a detecção do RNAm dos genes *fljA* e *flmA*. Já para a amostra 4C quando cultivada com antissoros anti-H48 e ou anti-4C foi possível detectar a presença de RNAm dos genes *fljA* e *flmA*. Quando cultivada em meio de cultura acrescido de antissoro anti-H54, obtivemos resultado positivo apenas para RNAm do gene *fliC*.

**Tabela 13: RT-PCR para detecção de RNAm em amostras *E. coli* 3C e 4C positivas para os genes de variação de fase:**

Amostra	Gene	Condições de cultivo	RT-PCR	Varição de fase
<b>1C (controle)</b>	<i>fliC</i>	-	<i>fliC</i> +	Negativa
<b>3C</b>	<i>fliC</i> ; <i>fljA</i> ; <i>flmA</i>	soro Anti-3C soro Anti-H54	- -	Negativa
<b>4C</b>	<i>fliC</i> ; <i>fljA</i> ; <i>flmA</i>	soro Anti-H54 soro Anti-H48 soro Anti-H54 + Anti-H48 soro Anti-4C soro Anti-4C + Anti-H54 soro Anti-4C + AntiH48	<i>fliC</i> <sub>4C</sub> +; <i>fliC</i> <sub>48</sub> <i>fljA</i> +; <i>flmA</i> + <i>fliC</i> <sub>4C</sub> + <i>fljA</i> +; <i>flmA</i> + <i>fliC</i> <sub>48</sub> + <i>fljA</i> +; <i>flmA</i> +	Positiva



**Figura I:** Produtos amplificados nas reações de RT-PCR para detecção de RNAm. 1- PPM. Para a amostra 4C cultivada com antissoro anti-H48: 2-16S1; 3- *fliC*<sub>4C</sub>; 4- *fljA*; 5- *flmA*; 6 - *fliC*<sub>H48</sub> negativo; 7- controle negativo. Amostra 4C cultivada com antissoro anti-H54: 8- 16S1; 9- 16S2; 10- *fliC*<sub>H48</sub>; 11- *fliC*<sub>4C</sub>; 12- *fljA* negativo; 13- *flmA* negativo. Amostra 4C cultivada com antissoros anti-h48+anti-H54: 14- 16S1; 15- 16S2; 16- *fliC*<sub>H48</sub> negativo; 17- *fliC*<sub>4C</sub>; 18- *fljA* negativo; 19- *flmA* negativo; 20- PPM

## **V) DISCUSSÃO**

---

## V.) DISCUSSÃO

A definição de patotipos de *E. coli* de acordo com sua capacidade de virulência pode implicar principalmente numa correlação entre fatores de patogenicidade e distintos sorotipos. Seis categorias de *E. coli* patogênica são descritas: EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, EAEC e DAEC. Ainda, neste contexto, há *E. coli* que podem causar infecções extraintestinais, como meningites, sepse (ExPEC) (Kaper *et al.*, 2004).

Muitos dos fatores de virulência de patotipos de *E. coli* são codificados por elementos genéticos móveis e acaba refletindo na conversão de vários sorotipos para um mesmo grupo patogênico (Brunner & Karch, 2000; Prager *et al.*, 2003) A conexão entre fatores de patogenicidade distintos com sorotipos distintos é observado entre as *E. coli* isolados de animais, alimentos e isolados clínicos. A sorotipagem dos antígenos O e H de amostras de *E. coli* potencialmente patogênicas é considerada a primeira linha de sua investigação. Apenas quando um sorotipo de um isolado clínico ou de animais é estabelecido, há a possibilidade de utilizar outros métodos para classificar as *E. coli* de acordo com seu potencial virulento. Em 1947, Kauffmann propôs uma metodologia para subtipar amostras, baseando-se nos principais antígenos de superfície da *E. coli*, permitindo o desenvolvimento do conhecimento da epidemiologia, ecologia e patogênese deste micro-organismo (Ewing, 1986; Ørskov & Ørskov, 1992). A identificação dos sorotipos é essencial para as investigações epidemiológicas, e na maioria dos casos, a sorotipagem completa dos antígenos O:K:H, é um bom indicador das relações clonais entre os isolados.

Desde então, a sorologia convencional tem sido utilizada para determinar os antígenos O e H de qualquer isolado de *E. coli*. Todavia, algumas dificuldades sempre existiram, principalmente com a sorotipagem de *E. coli* quando aplicada na rotina laboratorial. A expressão de antígenos H

pode ser muitas vezes demorada e dependente de estímulos ambientais. A sorologia pode mostrar reações cruzadas entre antissoros e os isolados podem mostrar-se imóveis; e ainda, os antígenos não mostram reação positiva com nenhum antissoro da coleção dos antissoros H padrão nas condições rotineiras disponíveis (Fields *et al.*, 1997; Prager *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2006).

Na expectativa de sorotipar todas as amostras de *E. coli* isoladas, métodos alternativos levando menos tempo que a sorologia convencional tem sido aplicados. Alguns estudos utilizando PCR-RFLP foram aplicados com bastante sucesso utilizando amostras isoladas de humanos e todos eles mostraram bons resultados na identificação de antígenos H (Prager *et al.*, 2003; Botelho *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2006).

Botelho *et al.*, (2003) propuseram a subtipagem do antígeno H de EPEC, STEC, EAEC e ETEC utilizando PCR-RFLP. Os resultados obtidos mostraram que a enzima de restrição *RsaI* foi capaz de discriminar os sorotipos H2, H6, H34, H40, que estavam relacionados com sorogrupos diarreia infantil no Brasil.

Prager *et al.* (2003), propuseram um estudo sobre a identificação dos antígenos H de EPEC, comparando as metodologias de proposta por Fields *et al.* (1997) e Machado *et al.* (2000), correlacionando com os resultados sorológicos. Amostras não-tipáveis sorologicamente puderam ser classificadas de acordo com o polimorfismo de *fliC* e que a PCR-RFLP poderia ser usada para detectar novos antígenos H.

Neste trabalho, diferentes produtos de PCR do gene *fliC* puderam ser detectados em todas as amostras H padrão (H1 a H56) que fazem parte da coleção de referência de H. Em nossa análise as amostras padrão para os antígenos H17, H25, H53 e H54 não amplificaram o gene *fliC*. Alguns destes resultados já eram esperados, uma vez que estes antígenos flagelares não são expressos por *fliC*, mas por outros genes: *flnA* (H17) (Ratiner *et al.*, 2010), *flkA* (H53) (Tominaga, 2004) e *flmA* (H54) (Tominaga, 2004). O gene do antígeno H25 não foi amplificado utilizando o iniciador

proposto por Fields *et al.* (1997), porém foi positivo para o iniciador proposto por Machado *et al.* (2000). Em 1998, foram descritos por Ratiner novos loci, *fll* (alelos de *fllA<sub>44</sub>* e *fllA<sub>55</sub>*, determinando antígenos H44 e H55 em *E. coli*) e *flm* (alelo *flmA<sub>54</sub>* para o antígeno H54). As amostras H3, H35, H36, H47 e H53 foram identificadas como portadoras do locus *fllk*. Entretanto, muitas destas linhagens expressando muitos destes antígenos H, são conhecidas por também possuírem o gene *fliC* (Wang *et al.*, 2003).

A identificação dos diferentes tipos de perfis de restrição (PCR-RFLP) dos antígenos H requer o conhecimento da margem de erro associada à determinação do tamanho do fragmento. O programa escolhido em geral minimiza este erro. Para experimentos (condições de eletroforese em gel, número de linhas em um gel, disposição dos marcadores de peso molecular) o erro associado com o tamanho do fragmento é fatalmente constante. Neste trabalho, as imagens foram submetidas ao programa Gel Compar II (Applied Maths-Belgium) para o estabelecimento dos diferentes perfis das amostras padrão de *E.coli*. Os resultados demonstrados pela identificação computacional são prováveis e robustos. Uma tolerância entre os tamanhos dos fragmentos de 3,5% é observada e aceitável quando utilizado padrão de peso molecular interno. Para o padrão de peso molecular externo há uma tolerância de 10%, devido ao erro associado com os fragmentos menores. Entretanto, a identificação é robusta porque os perfis de restrição das amostras padrão demonstraram resultados suficientemente diferentes. Geralmente, as amostras de *E.coli* que geram o mesmo tipo de perfil de restrição são conhecidas por reagir cruzadamente em experimentos de aglutinação, pela alta homologia da sequência de DNA e por possuir o mesmo morfotipo (Fields *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2000).

Moreno *et al.* (2006) demonstraram que a técnica de PCR-RFLP poderia substituir a sorologia para a identificação de antígenos H. As amostras H1 e H12, H3 e H16, H5 e H55, H11 e H27 apresentaram o mesmo perfil de digestão, sendo que as amostras H padrão H1, H11, H12 e

H27 foram diferenciados utilizando outra a enzima *HhaI*, enquanto que os perfis de restrição das amostras H3 e H16, H5 e H55 permaneceram indistinguíveis. É importante ressaltar que estes antígenos H podem apresentar reações cruzadas na sorologia, uma vez que possuem epítomos comuns. Em nosso trabalho, as amostras H1, H28 e H31; H3 e H8; H2, H30 e H35; H9 e H14; H11 e H47; H7, H19 e H27; H55 e H56 apresentaram o mesmo perfil de restrição utilizando os iniciadores FliC(F) e a endonuclease *RsaI*. Por outro lado, quando o *fliC* das amostras padrões foram amplificadas com os iniciadores FliC(M) e a enzima *HhaI* foi utilizada, observamos perfis de restrições semelhantes nas amostras H3 e H8; H6, H10, H19 e H27; H11 e H47, H23 e H43; H28 e H42; H55 e H56.

Destacando que o gene *fliC* das amostras padrões H3 e H8; H11 e H47; H19 e H27; H55 e H56, apresentaram perfis de restrições semelhantes em ambos os experimentos, mas distintos quando comparados entre si.

Em nosso trabalho, nove amostras que apresentavam antígenos H com fenótipo não tipável nos métodos sorológicos puderam ser identificadas no grupo H1 a H56 utilizando metodologia de PCR-RFLP (Tabela 9), duas amostras H16, três amostras H34, duas H2, uma amostra H33 e uma H38. Todas as amostras não reagiram sorologicamente com nenhum antissoro H padrão, com exceção à uma amostra com perfil PCR-RFLP tipo H2 que na sorologia reagia cruzadamente com os antissoros anti-H38 e anti-H48. Moreno *et al.* (2006) e Badri *et al.* (2010) também classificaram amostras não tipáveis na sorologia convencional utilizando PCR-RFLP e mostrou que este método pode ser eficiente, levando em consideração a execução e o custo.

Associada à técnica de PCR-RFLP, utilizando sequenciamento de DNA, é possível, além de caracterizar o antígeno H de outras amostras, identificarem novos genes para flagelina em amostras de *E. coli* HNT. Entre amostras não tipáveis, é possível que o perfil de restrição não corresponda aos perfis dos genes das flagelinas H1 a H56, necessitando análise de

sequenciamento do gene *fliC* para melhor caracterizá-lo ou confirmar se realmente se trata de um novo tipo de antígeno H. Isto pode ser confirmado através da obtenção de antissoros e testes de aglutinação para conhecer o grupo H de referência. Definido e estabelecido o novo antígeno H, é necessário enviá-lo para testes de validação no International *Escherichia* and *Klebsiella* Centre (WHO).

Wang *et al.* (2003) utilizando análise do sequenciamento, caracterizaram o gene *fliC* de 43 dos 53 antígenos H expressos pelo gene *fliC*. Através da construção deste banco de dados, ficou muito mais eficiente para caracterização de antígenos H, utilizando apenas seqüências parciais do gene, pois as porções N- e C- terminais são conservadas entre todos os antígenos e o sequenciamento da região polimórfica pode caracterizar o gene utilizando o banco de dados disponível no GenBank. O sequenciamento total do gene não é necessário, desde que a porção central do gene apresente alto índice de similaridade com genes descritos previamente ou se traduza numa seqüência de aminoácidos que gere a mesma proteína. Em nosso trabalho, identificamos cinco genes *fliC* através do sequenciamento parcial do gene, pois apresentaram homologia com os antígenos H7 (duas amostras), H25 (duas amostras) e H32 (1 amostra). Entretanto, as duas amostras caracterizadas como H25 no sequenciamento apresentaram sorologia cruzada com os antissoros anti-H38, anti-H48, anti-H51. As demais não reagiram com nenhum dos antissoros H padrão. As análises fenotípicas das amostras contradizem os estudos genotípicos. O que nos leva a crer que a análise do gene *fliC* destas amostras não necessariamente é o mesmo gene expresso, pois mutações não sinônimas e mudança de frame de leitura do gene, pode levar à uma inativação da proteína. (Griffiths *et al.*, 2006), pois as amostras são móveis, demonstrando apresentar mais de um sistema gênico de expressão de flagelina ou outro gene *fliC* funcional.

Três amostras apresentaram genes não descritos: a amostra 3C que apresentou alta homologia com H2 e H35, mas com sequência traduzida como antígeno H2 e que não reage com os antissoros H2 e/ou H35, definimos o antígeno expresso como H2, porém com gene *fliC<sub>H2</sub>*.

Botelho *et al.*, (2003), verificaram que os sorotipos O128:H2 e O128:H35 (EPEC atípica) apresentaram o mesmo perfil de restrição através da análise da PCR-RFLP e que na sua sequência nucleotídica, os antígenos H2 e H35 diferiram somente 1,4% dos 498 aminoácidos. Isto sugere que as diferenças sorológicas entre os antígenos H2 e H35 decorrem de pequenas alterações na flagelina. Fields *et al.*, (1997) já tinham observado a ocorrência de um padrão comum do perfil de restrição entre os antígenos H2 e H35. O antígeno H2 detectado em nosso trabalho e expresso por esta amostra pode apresentar a estrutura diferenciada, não podendo ser reconhecida pelo antissoro padrão.

A amostra 40C apresentou homologia à sequências de gene *fliC* de *E. coli* e de *Shigella boydii*, sendo por nós identificadas como um novo gene. Algumas linhagens patogênicas de EIEC apresentam homologia com sorotipos de *Shigella*. As EIEC são fisiologicamente semelhantes à *Shigella*, sendo lisina descarboxilase e lactose negativas, não móveis (Ewing, 1986). Contudo, EIEC apresentam *fliC* gene, muitas vezes com inserções e deleções, mutações que podem levar a um fenótipo não móvel ou a uma flagelina defectiva (Amhaz *et al.*, 2004). O gene *fliC* no gênero *Shigella* mostra inúmeras deleções e elementos IS, sugerindo que a perda da motilidade deste gênero é um evento recente. A amostra 40C é um isolado de ave, com sorogrupo O121 e que não apresenta correlação com o grupo EIEC.

O presente trabalho mostra que a transferência horizontal de genes e recombinações pode levar ao surgimento de diferentes flagelinas dentro de uma espécie bacteriana. Há também evidências de DNA livre seja uma das principais fontes de recombinação, gerando novos alelos e assim a diversidade antigênica do gene *fliC* (Selander *et al.*, 1996).

A amostra 4C que apresentou gene com 100% similaridade à sequência de *fliC* descrita pela Dra. Monique Ribeiro Tiba em sua tese de doutorado com números de acesso no GenBank GQ423574. O resultado do sequenciamento e estudo de bioinformática confirmaram que a sequência de aminoácidos da amostra 4C, assim como a do antígeno descrito no trabalho anterior apresentariam 99% de similaridade com o antígeno H21, sendo que um aminoácido, isoleucina, foi substituído por uma treonina. Esta troca de aminoácidos pode alterar a proteína ou torná-la não-funcional (Griffiths *et al.*, 2006 ). Isto poderia explicar o porquê desta amostra não ser identificada pela sorologia com o antissoro anti-H21. As três sequências totais dos genes *fliC* das amostras HNT 3C, 4C e 40C foram depositadas no GenBank com número de acesso HQ116826 a HQ116828.

Foi observado que podem existir diferenças a respeito dos genes bacterianos e seus fenótipos em amostras HNT, uma vez que, somente os antissoros que reconheceram os antígenos não necessariamente, corresponderam à análise genética. A proteína flagelina das amostras HNT pode ser estruturalmente diferente do antígeno padrão, mas pode apresentar epítomos comuns com aqueles dos antígenos H padrão. É relatado na literatura que um mesmo antígeno H pode ter sequências genóticas diferentes, apesar de gerarem os mesmos resultados fenotípicos (Wang *et al.*, 2000; Johnson & Stell, 2001; Beutin & Strauch, 2007).

Os antissoros produzidos pelos antígenos H não identificados por PCR-RFLP ou por sequenciamento apresentaram altos títulos frente aos antígenos H homólogos e baixos títulos com os antígenos H controle (H1 a H56), sugerindo que pode se tratar realmente de proteínas de conformação diferenciada em relação aos antígenos H padrão.

Estes resultados indicam que apesar de determinados antígenos apresentarem na análise genotípica semelhanças com antígenos H padrão, expressam proteína diferente. Foi observado que podem existir diferenças fenotípicas e genotípicas nestas amostras HNT em relação aos

resultados dos antígenos padrão, uma vez que, somente o antissoro das amostras HNT reagiu com os antígenos padrão. A proteína flagelina das amostras HNT pode ser estruturalmente diferente do antígeno padrão, mas pode apresentar epítomos comuns com aquele do antígeno H padrão.

Por um longo tempo, acreditou-se que *E. coli* possuíam apenas um gene *fliC* em seu cromossomo, expressando apenas um único tipo de antígeno flagelar (monofásico). Entretanto, têm sido descrito que linhagens de *E. coli* que espontaneamente mudam de antígeno H, através de um sistema gênico semelhante ao sistema de variação de fase flagelar da *Salmonella sp* (Ratiner, 1982; Ratiner, 1983; Ratiner 1998; Tominaga 2004; Tominaga & Kutsukake, 2007; Ratiner *et al.*, 2010). A variação de fase é alternativamente expressa por dois diferentes genes para flagelina (Feng *et al.*, 2008). O fenômeno de variação de fase está relacionado à sobrevivência bacteriana na presença do sistema imune do hospedeiro, e desta forma está associado à virulência bacteriana. Em 1982 e 1983, Ratiner demonstrou que *E. coli* Bi7327-41 (O53:K-:H3) e P12b (O15:H17) eram capazes de mudar seus antígenos flagelares para H16 e H4, respectivamente. A mudança do antígeno H na linhagem Bi7327-41 seria controlada por um sistema gênico parecido com o sistema de *Salmonella*. Mais tarde, Ratiner *et al.* (2010) denominaram o *flnA* como gene responsável pela expressão do antígeno H17. O gene que codifica para o tipo de antígeno H16 é um alelo de *fliC*, enquanto outro gene associado à mudança de fase e expressão do antígeno H3 foi denominado *flkA* e a presença de um gene repressor de *fliC*, denominado *fljA* poderia estar ativo (Ratiner, 1983). Isto sugere que a evolução esteja conectada com o caráter difásico e que, pelo menos uma parte das linhagens monofásicas com estes antígenos, representem variantes em que o alelo repressor tenha sido deletado, alterado ou estabilizado em um estado “off” (Ratiner, 1983). Além disso, este mecanismo difásico indica diversidade no arranjo dos genes responsáveis pela especificidade do antígeno flagelar (Ratiner, 1985). Até o momento, nenhum estudo mostrou em bactérias “selvagens” experimentos que comprovassem a variação de fase espontânea.

Neste trabalho, detectamos a presença dos genes *fliC* e *flmA* nas amostras H padrão H11, H35, H40 e H47. Estas amostras não apresentaram variação de fase *in vitro*, sugerindo que *flmA* pode estar silenciado ou inativo. A presença do gene *fljA* não foi detectado nas amostras H11, H40 e H47. Feng *et al.* (2008) mostraram em seu trabalho a presença de *flk* GI nas amostras H3, H35, H36 e H47, que por apresentar elementos de inserção entre os genes *fljA* e *flkA*, as amostras H35 e H36 não apresentaram atividade repressora, expressando exclusivamente *flkA*. Nas amostras H3 e H47 os genes foram funcionais, variando a fase flagelar para os antígenos H16 e H21, respectivamente. Contudo a reversão não foi descrita, pois as amostras com capacidade de reverter a fase *flkA* → *fliC* tiveram a *flk* GI inativada ou simplesmente subtraída.

A detecção de *flmA* nas amostras H padrão não era esperado, uma vez que na literatura, apenas a amostra H54 era portadora deste gene. Uma hipótese é que, segundo Tominaga (2004) a região de inserção do locus *flm* está entre os genes *yicC* e *yicK* e que, nesta região, além dos genes em questão, estão inseridos inúmeros elementos de inserção (IS) envolvidos na integração e recombinação de DNA livre. E ainda, que a presença destes elementos de inserção adicionada à presença de sequências de bases repetidas no locus, mostra que a aquisição destes genes pela amostra H54 é um evento recente.

Nosso trabalho mostra que apesar de não haver relatos na literatura a respeito das amostras H11, H35, H40 e H47 serem portadoras de *flmA*, o rearranjo cromossômico pode acontecer, porém, neste caso, sem sucesso, pois as amostras H padrão *flmA* positivas (com exceção da amostra H54) não apresentaram o fenótipo H54.

Detectamos também a presença do gene *flmA* em 7 amostras HNT, e ainda, os genes *fljA* e *flmA* foi detectado nas amostras 3C e 4C. Comprovamos através do sequenciamento dos genes *fljA*, *flmA* e *flkA* os estudos realizados por Ratiner (1983), Tominaga (2004) e Feng *et al.* (2008) onde as amostras H35, H53 e H54 apresentam genes distintos de *fliC* para expressão da flagelina.

Os genes *fljA* presente nas amostras 3C e 4C apresentaram homologia com *fljA* de *Salmonella* sp, sugerindo uma possível transferência horizontal do gene, já que o operon está localizado numa GI. O gene *flmA* de 7 amostras HNT e a amostra 3C, também portadora do gene *fljA* não foram determinados, pois não obtivemos sequencias confiáveis através da técnica de sequenciamento.

No intuito de verificar se havia alguma amostra HNT que poderia alterar seu fenótipo, variando a fase flagelar, preparamos um protocolo baseado na metodologia descrita por Ewing (1986) para indução de fase, fase reversão de *Salmonella*. A técnica consistiu em adicionar no meio de cultura semi-sólido antissoros anti-H de uma fase específica, induzindo a bactéria a expressar o outro fenótipo para continuar móvel. Técnicas semelhantes foram utilizadas por Tominaga (2004) e Feng *et al.* (2008), utilizando Agar de motilidade em placas acrescidas de antissoros. Tominaga demonstrou a expressão dos genes em *Salmonella* mutante  $\Delta fljBA$  e portadora dos genes *fljA* e *flmA*. A amostra mostrou motilidade em meio de cultura acrescido do antissoro anti-i (*fliC*). Feng *et al.* (2008) utilizando amostras padrão H3 e H47, mostraram variação de fase unilateral, alternando a fase flagelar para H16 e H21, respectivamente.

Neste experimento, a amostra 4C mostrou reação cruzada com os antissoros anti-H48 e anti-H54. Por esta razão, foram os primeiros antissoros adicionados aos meios de cultura para indução da fase flagelar. Sabe-se que o antígeno H48 é expresso pelo gene *fliC* e o antígeno H54 pelo gene *flmA* (Tominaga, 2004). Os testes de variação de fase mostraram que a amostra 4C possui um gene *flmA* que expressa ativamente uma flagelina, pois quando a bactéria foi cultivada na presença do antissoro anti-H48, a amostra apresentou fenótipo H54. Para comprovar a reversão da fase, cultivamos a amostra 4C com antissoro anti-H54. A bactéria alternou a fase flagelar apresentando fenótipo H48. Para então imobilizar a amostra, adicionamos ao meio de cultura antissoro anti-H48 e anti-H54. Entretanto, a amostra apresentou-se móvel, porém com fenótipo HNT, que mais tarde foi identificada por sorologia de se tratar de um novo antígeno 4C. Assim, a

amostra 4C apresenta os genes *fljA*, *flmA*, *fliC<sub>48</sub>* e *fliC<sub>4C</sub>*, que por dedução, *fliC<sub>4C</sub>* deve se tratar do novo gene detectado através da técnica de sequenciamento. A amostra 3C não demonstrou variação de fase com os antissoros testados, sendo imobilizada quando adicionamos o antissoro anti-3C no meio de cultura.

Feng *et al.* (2008) investigaram o envolvimento de *flk* GI na variação da fase flagelar em *E. coli*. Reportaram que, quando *flk* GI está presente no cromossomo, a expressão do operon *flkAB* é direcionada, reprimindo *fliC* e a proteína FlkA é expressa. Contudo, para a expressão de *flk*, a forma para variação flagelar é unilateral: *fliC<sub>off</sub>→flkA<sub>on</sub>* ou *fliC<sub>on</sub>→flkA<sub>none</sub>*. Ratiner *et al.* (2010) demonstraram o mesmo fenômeno e que a variação unilateral resultou na perda do genótipo flagelar original e o fenótipo da *E. coli* padrão H17 (P12b) tem dois genes distintos, *flnA* e *fliC*, que codifica os antígenos H17 e H4, respectivamente. Nos nossos experimentos com as amostras que possuíam *fliC* e *flmA*, confirmamos que as amostras apresentam um repressor funcional e que a forma de expressão dos genes é: *fliC<sub>on</sub>→flmA<sub>off</sub>* ou *fliC<sub>off</sub>→flmA<sub>on</sub>*. Este é o primeiro trabalho onde foi possível detectar mais de um gene de expressão de flagelina expressos alternadamente e espontaneamente.

Técnicas moleculares como PCR e sequenciamento tem sido amplamente empregadas para detecção de muitos patógenos (Wang *et al.*, 1997). Entretanto, estas técnicas não demonstram e nem trazem a informação de viabilidade celular e não pode distinguir moléculas de DNA livres ou mostrar se o gene está realmente sendo expresso. O RNAm pode ser usado como marcador de viabilidade celular, pois ele também é destruído após a morte celular. A detecção do RNAm mostra a viabilidade celular e a expressão do DNA, algo que a análise apenas do DNA cromossômico não demonstra se os genes de interesse estão realmente sendo expressos, não podendo associar a detecção genética com a expressão fenotípica do gene (Morin *et al.*, 2004). A

fim de validar a hipótese criada, nós optamos por detectar a expressão dos genes de variação de fase na amostra 4C através da detecção do RNAm.

Para que a detecção do RNAm fosse válida para a amostra 4C, realizamos o cultivo da bactéria em meios contendo antissoros anti-H48, anti-H54 e anti-H4C. Os iniciadores foram desenhados baseados nas sequências dos genes *fljA*, *fliC<sub>48</sub>*, *flmA<sub>54</sub>* e *fliC<sub>4C</sub>*. Os resultados obtidos confirmaram a nossa hipótese de variação de fase flagelar, pois foram detectados os RNAm de cada flagelina em cada situação específica (Tabela 13). Na presença do antissoro anti-H48 no meio de cultura, pudemos detectar o RNAm dos genes *fljA* e *flmA<sub>54</sub>*. Já na presença do antissoro anti-H54, detectamos apenas a presença do RNAm de *fliC*. Quando adicionados simultaneamente os antissoros anti-H48 e anti-H54, foi detectada a presença apenas do gene *fliC<sub>4C</sub>*. Esta é a prova cabal do fenômeno de variação de fase flagelar e mostrar a funcionabilidade dos genes na amostra 4C.

Neste trabalho, conseguimos identificar antígenos H através de PCR-RFLP. Em cinco amostras isoladas de bovinos, duas delas foram sorotipadas como O20:H16, associadas à STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga), uma como O123:H34, uma O141:H34 e uma O159:H34, sendo o antígeno H34 associado à alguns sorogrupos de STEC isolado de bovinos. Duas amostras isoladas de suínos foram subtipadas utilizando a mesma técnica como O128:H2 e duas amostras isolada de carneiro identificadas como O157:H33 e O8:H38, todos os antígenos H estão associados à doença no homem e em suínos. Através de sequenciamento, caracterizamos duas amostras isoladas de suínos como sorotipo O11:H7 e uma ONT:H32. Duas amostras isoladas de carneiro foram sorotipadas como O42:H25, sendo o sorogrupo O42:H? amplamente isoladas de ovinos e causando enfermidades (<http://www.usc.es/ecoli/>- 11/10/2010).

Os antissoros das amostras HNT que apresentaram gene não descrito poderão ser reconhecidos quando submetidos Centro de Referência Internacional em *Escherichia* e *Klebsiella* (The International *Escherichia* and *Klebsiella* Centre), em Copenhague, Dinamarca.

A sobrevivência bacteriana pode ser afetada pela ausência da flagelina e a flagelina codificada pelo gene *flmA* pode oferecer uma vantagem adaptativa no ambiente onde a bactéria se encontra. Estes estudos moleculares podem mudar o panorama dos antígenos H, tanto no aspecto sorológico quanto molecular. Considerando a sorologia como um método “ouro” na tipagem de antígenos H, estas descobertas podem contribuir para o entendimento da expressão flagelar de amostras de *E. coli* e de outras Enterobacteriaceae não tipáveis.

## **VI) CONCLUSÕES**

---

## VI) Conclusões

- PCR-RFLP é uma técnica que permite a construção de um banco de dados dos perfis de restrição dos antígenos flagelares padrão, podendo identificar amostras não tipadas pela sorologia convencional;
- PCR-RFLP pode auxiliar na identificação de sorotipos de amostras de *E. coli*, devido ao tempo de execução e custo;
- O sequenciamento parcial do gene *fliC* auxiliou na identificação dos antígenos H das amostras de *E. coli* HNT;
- O sequenciamento total do gene *fliC* de amostra HNT identificou dois novos genes de flagelina e um gene *fliC<sub>h2</sub>'*;
- Os antissoros produzidos contra os antígenos HNT das amostras não reagiram com os antígenos H padrão, demonstrando se tratar de proteínas diferentes expressas pelos antígenos homólogos, confirmando ser uma proteína não descrita;
- Os genes *fljA*, *flkA* e *flmA* foram detectados e seqüenciados nas amostras padrão correspondentes H3, H35, H53 e H54;
- Sete amostras HNT foram portadoras do gene *flmA*, porém sem correlação com variação de fase;
- Comprovamos a amostra *E. coli* HNT 4) é capaz de realizar variação de fase flagelar em ensaios genotípicos e fenotípicos;
- Identificamos por RT-PCR que a amostra 4C apresenta em seu genótipo *fljA*, *flmA*, *fliC<sub>48</sub>* e *fliC<sub>4C</sub>* funcionais;

- A amostra 4C apresenta a forma de variação de fase flagelar:  $fliC_{on} \rightarrow flmA_{off}$  ou  $fliC_{off} \rightarrow flmA_{on}$ ;
- Este é o primeiro trabalho onde foi possível detectar mais de um gene de expressão de flagelina expressos alternadamente e espontaneamente;
- Este também é o primeiro trabalho onde verificamos a funcionabilidade de três genes de flagelina em uma única amostra de *E. coli*.

## **VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMHAZ, J., M. K., ANDRADE, A., BANDO, S. Y., TANAKA, T. L., MOREIRA-FILHA, C. A., MARTINEZ, M. B. Molecular typing and phylogenetic analysis of enteroinvasive *Escherichia coli* using the *fliC* gene sequence. **FEMS Microbiol. Lett.** 235: 259-264, 2004.
- APEL, D. & SURETTE, M.G. Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. **Bioch Bioph Acta.** 1778: 1851-1858, 2008.
- BADRI, S., FASSOUANE, A., FILLIOL, I., HASSAR, M., COHEN, N. Sequence analysis of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* isolated from food in Morocco. **J Microbiol.** 48:184-7, 2010.
- BLANCO, J., BLANCO, M., ALONSO, M.P., BLANCO, J.E., GARABAL, J.I., GONZÁLEZ, E.A. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2. **FEMS Microbiol Lett.** 15:155-9, 1992.
- BLANCO M., BLANCO, J.E., MORA, A., REY, J., ALONSO, J.M., HERMOSO, M., HERMOSO, J., ALONSO, M.P., DAHBI, G., GONZÁLEZ, E.A., BERNÁRDEZ, M.I., BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. **J Clin Microbiol.** 41:1351-6, 2003.
- BALDY-CHUDZIK, K. & STOSIK, M. Diversity of *fliC* gene in commensal *Escherichia coli* derived from various mammals. **Folia Microbiol.** 52: 261-272, 2007.
- BEUTIN, L. & STRAUCH, E. Identification of sequence diversity in the *Escherichia coli fliC* genes encoding flagellar types H8 and H40 and its use in typing of Shiga toxin-producing *E. coli* O8, O22, O111, O174, and O179 strains. **J. Clin. Microbiol.** 45: 333-339, 2007.

BOTELHO, B. A., BANDO, S. Y., TRABULSI, L. R., MOREIRA-FILHO, C. A. Identification of EPEC and non-EPEC serotypes in the EPEC O serogroups by PCR-RFLP analysis of the *fliC* gene. **J. Microbiol. Methods.** 54: 87-93, 2003.

BRUNDER, W., KARCH, H. Genome plasticity in Enterobacteriaceae. **Int. J. Med. Microbiol.** 290: 153-165, 2000.

CASEY, T.A., NAGY, B., MOON, H.W. Pathogenicity of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* that do not express K88, K99, F41 or 987P adhesions. **Am. J. Vet. Res.** 53: 1488-1492, 1992.

CHEVANCE, F. F. V. & HUGHES, K. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. **Nature.**6: 455-465, 2008.

CLARET, L., & HUGHES, C. Interaction of the atypical prokaryotic transcription activator flhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> with early promoters of the flagellar gene hierarchy. **J. Mol. Microbiol.** 321: 185-199, 2002.

CLARKE, S.T. Diarrheogenic *Escherichia coli* – an emerging problem? **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 41: 93-98, 2001.

CHILCOTT, G., S. & HUGHES, K., T. Coupling of flagellar expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64: 694-708, 2000.

DePAMPHILIS, M., L & ADLER, J. Purification of intact flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**105: 376-383, 1971.

DIGGLE, S.P., WINZER, K., LAZDUNSKI, A., WILLIAMS, P., CAMARA, M. Advancing in the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactose production and virulence gene expression. **J. Bacteriol.** 184: 2576- 2586, 2002.

DOZOIS, C.M., CHANTELOUP, N., DHO-MOULIN, M., BREE, A., DESAUTELS, C., FAIRBROTHER, J.M. Bacterial colonization and “in vivo” expression of F1 (Type I) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Dis.** 38: 231–39, 1994.

ECHETA, M.A. & USERA, M.A. Rapid identification of *Salmonella* spp. phase 2 antigen of the H1 antigenic complex using “multiplex PCR”. **Res. Microbiol.** 149: 757-761, 1998.

EWING, W.H. The genus *Escherichia*. In: EDWARDS, P. R; EWING, W. H. Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4rd Ed. Minneapolis, Burgess, p. 93-134, 1986.

FENG, L; LIU, B; LIU, Y; RATNER, Y. A; HU, B; LI, D; ZONG, X; XIONG, W; WANG, L. A genomic islet mediates flagellar phase variation in *Escherichia coli* strains carrying the flagellin-specifying locus *flk*. **J. Bacteriol.** 190, 2008.

FIELDS, P.I.; BLOM, K.H.; HUGHES, J.H.; HELSEL, L.O.; FENG, P.; SWAMINATHAN, B. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. **J. Clin. Microbiol.** 35:1066-1070, 1997.

FRANCIS, D.H., GRANGE, P.A., ZEMAN, D.H. *et al.* Expression of mucin-type glycoprotein K88 receptors strongly correlates with piglet susceptibility to K88+ enterotoxigenic *Escherichia coli*, but adhesion of this bacterium to brush borders does not. **Infect. Immun.** 66: 4050-4055, 1998.

GANNON, V.P., D'SOUZA, S., GRAHAM, T., KING, R.K., RAHN, K., READ, S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.** 35: 656-662, 1997.

GARCIA, A., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A., ORDEN, J.A., DE LA FUENTE, R. Diarrhea neonatal del ternero: factores etiológicos. **Prod. Animal.** 147: 19-37, 1999.

GRIFFITHS, A. J. F; WESSLER, S. R; LEWONTIN, R. C; GELBART, W. M. SUZUKI, D. T. Introdução à Genética, 8ª ed, Guanabara Koogan, 2006.

GROSS, W.G. Diseases due to *E.coli* in Poultry. In: GYLES, C.L. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International: Oxon, 1994, 237–59.

GYLES, C.L. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, UK, 1994.

HOMMA, M., KUTSUKAKE, K., HASEBE, M., LINO, T., MACNAB, R.M. FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. **J. Mol. Microbiol.** 211: 465-477, 1990.

HUSSEIN, H.S. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. **J Anim Sci.** 85:63-72, 2007.

JOHNSON, J. R & RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*”. **J. Lab. Clin. Med.** 139: 155-160, 2002.

JOHNSON, J. R & STELL. PCR for specific detection of H7 flagellar variant of *fliC* among Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** 39: 3712-3717, 2001.

JOYS, T. M & SCHODEL, F. Epitope mapping of the d flagellar antigen of *Salmonella muenchen*. **Infect. Immun.** 59: 3330-3332, 1991.

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

KAUFFMANN, F., 1947. The serology of the *Coli* group. **J. Immunol.** 57:71-100.

LAWN, A. M. Comparison of the flagellins form different flagellar morphotypes of *Escherichia coli*. **J. Gen. Microbiol.** 101: 112-130, 1977.

LEVINE, M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J. Infect. Dis.** 155:377-389.

- LIOR, H., 1994. Classification of *Escherichia coli*. p 31-72. In: C.L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International Wallingford, UK.
- MACHADO, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D., 2000. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of amplified *fliC* gene. **Res. Microbiol.** 151: 535-546.
- MACNAB, R. M. Flagella. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: **Cellular and Molecular biology**, 1987.
- MACNAB, R. M. Genetics and biosynthesis of bacterial flagella. **Ann. Rev. Genet.** 26:129-156, 1992.
- MACNAB, R. M. How bacteria assemble flagella. **Annu. Rev. Microbiol.** 57: 77-100, 2003.
- MATTSSON, S., WALLGREN, P. Phenotyping of *E. coli* serotypes associated to oedema disease. **Acta Vet Scand.** 2:50-13, 2008.
- MORENO, R.A.C., CABILIO GUTH, B.E., BAQUERIZO MARTINEZ, M.2006. Can the *fliC* PCR-restriction fragment length polymorphism technique replace classic serotyping methods for characterizing the H antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains? **J. Clin. Microbiol.** 44: 1453-1458.
- MORIN, N. J., GONG, Z., LI, X. F. Reverse transcription-multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1, and *Salmonella Typhi*. **Clin Chem.** 50: 2037-2044, 2004.
- NAMBA, K.; YAMASHITA, I.; VONDERVISZT, F. Structure of the core and central channel of bacterial flagella. **Nature.** 342:648-654, 1989.
- NATARO, J.P. & KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11:142-201, 1998.

ORDEN , J.A., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A. CID, D., GARCÍA, S., DE LA FUENTE, R. Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. **Vet. Microbiol.** 66: 265-273, 1999.

ØRSKOV, F. & ØRSKOV, I. Two new *Escherichia coli* O antigens, O162 and O 163, and one new H antigen, H56. Withdrawal of H antigen H50. **Acta Path. Microbial. Scand.**83: 121-124, 1975.

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

ØRSKOV, I & ØRSKOV, F. *Escherichia coli* serotyping and in man and animals. **Can. J. Microbiol.** 38: 699-704, 1992.

PRAGER, R., STRUTZ, U., FRUTH, A., TSCHAPE, H. Subtypng of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)-antigen: serotyping versus *fliC* polymorphisms. **Int. J. Med. Microbiol.** 292:447-486, 2003.

RATINER, Y.A. Phase variation of the antigen in *Escherichia coli* strain Bi7327-41, the standard strain for *Escherichia coli* flagellar antigen H3. **FEMS Microbiol. Lett.** 15: 33-36, 1982.

RATINER, Y.A. Presence of two structural genes determining antigenically different phase-specific flagellins in some *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiol. Lett.** 19: 37-41, 1983.

RATINER, Y.A. New flagellin-specifying genes in some *Escherichia coli* strains. **J. Bacteriol.** 180: 979-984, 1998.

RATINER, Y. A. Temperature-dependent flagellar antigen phase variation in *Escherichia coli*. **Res. Microbiol.** 150: 457- 463, 1999.

RATINER, Y.A., SIHVONEN, L.M., LIU, Y., WANG, L., SIITONEN, A. Alteration of flagellar phenotype of *Escherichia coli* strain P12b, the standard type strain for flagellar antigen H17, possessing a new non-*fliC* flagellin gene *flnA*, and possible loss of original flagellar phenotype

and genotype in the course of subculturing through semisolid media. **Arch Microbiol.** 192:267-78, 2010.

RAMOS, H.C., RUMBO, M., SIRARD J.C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune response in mucosa. **Trends Microbiol.**, 12:509-517, 2004.

REID, S. D; SELANDER, R. K; WHITTAM, T. S. Sequence diversity of flagellin (*fliC*) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 181: 153-160, 1999.

SAMATEY, F. A; IMADA, K; NAGASHIMA, S; VONDERVISZT, F; KUMASAKA, T; YAMAMOTO, M; NAMBA, K. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. **Nature.** 410: 331-337, 2001.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F; MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2ed. CSH, 1989.

SCHEUTZ, F.; CHEASTY, T.; WOODWARD, D.; SMITH, H.R. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include verocytotoxin-producing *E. coli* (VETC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. **APMIS** 112:569-584, 2004.

SCHOENHALS. G & WHITFIELD, C. Comparative analysis of flagellin sequences from *Escherichia coli* strains possessing serologically distinct flagellar filaments with a shared complex surface pattern. **J. Bacteriol.** 175: 5395-5402, 1993.

SEAH. J.N & KWANG. J. Identification of H-specific determinants in flagellin of four *Escherichia coli* strains. **Arch Microbiol.** 174: 28-34, 2000.

SELANDER, R.K., SMITH, N.H., LI, J., BELTRAN, P., FERRIS, K.E., KPECKO, D.J., RUBIN, F.A. Molecular evolutionary genetics of the cattle-adapted serovar *Salmonella dublin*. **J Bacteriol.** 174: 3587-3592, 1992.

SELANDER, R. K., LI, J., NELSON, K. Evolutionary genetics of *Salmonella enterica*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Microbiology (Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, N., Schaechter, M. Umberger, H.E., 2nd Eds, p.2691–2707. ASM Press, Washington DC, 1996.

SHAPIRO, L. The bacterial flagellum: from genetic network to complex architecture. **Cell**. 80:525-527, 1995.

SILVA, N., SILVEIRA, N.F.A., CONTRERAS, C., BERAQUET, N.J., YOKOYA, F., NASCIMENTO, C.A., OLIVEIRA, V.M., TSE, C.L. Ocorrência de *E. coli* O157:H7 em produtos cárneos e sensibilidade dos métodos de detecção. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**. 21: 223-227, 2001.

SILVERMAN, M & SIMON, M. I. Bacterial flagella. **Ann. Rev. Microbiol.** 31: 397- 419, 1977.

SMITH, N. H & SELANDER, R. K. Sequence invariance of the antigen-coding central region of the phase 1 flagellar filament gene (*fliC*) among strains of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.** 172: 603-609, 1990.

SOUTOURINA, O.A., BERTIN, P.N. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Rev.** 27:505-23, 2003.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli*: Mechanism of virulence. Cambridge University Press, 1ed, 1997.

TOLEDO, M. R. F; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Rev. Microbiol.** 13: 230-235, 1982.

TOMINAGA, A. Characterization of six flagellin genes in the H3, H53 and H54 standard strains of *Escherichia coli*. **Genes Genet. Syst.** 79: 1-8, 2004.

TOMINAGA, A & KUTSUKAKE, K. Expressed and cryptic flagellin genes in the H44 and H55 type strains of *Escherichia coli*. **Genes Genet. Syst.** 82: 1-8, 2007.

WANG, R.F., CAO, W.W., CERNAGLIA, C.E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of food borne pathogens in foods. **J. Appl. Microbiol.** 83: 727–36, 1997.

WANG, L.; ROTHEMUND, D.; CURD, H.; REEVES, P. R. Sequence diversity of the *Escherichia coli* H7 *fliC* genes: Implication for a DNA-based typing scheme for *E. coli* O157:H7. **J. Clin. Microbiol.** 38: 1786-1790, 2000.

WANG, L.; ROTHEMUND, D.; CURD, H.; REEVES, P.R. Species-wide variations in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. **J. Bacteriol.** 185:2936-2943, 2003.

WHITFIELD, C; WALKER, S. G; ATKINSON, C. F; LAM, J. S; MACDONALD, L. A; BEVERIDGE, T. J; ORSKOV, I; ORSKOV, F. Serotype-specific monoclonal antibodies against the H12 flagellar antigen of *Escherichia coli*. **J. Gen. Microbiol.** 134: 1747- 1753, 1988.

WILSON, R.A., FRANCIS, D.H. Fimbriae and enterotoxins associated with *E. coli* serogroups isolated from clinical cases of porcine colibacillosis. **Am. J. Vet. Res.** 47: 213-217, 1986.

WINSTANLEY, C & MORGAN, J. A. W. The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. **Microbiology.** 143: 3071-3084, 1997.

YONEKURA, K., MAKI, S., MORGAN, D.G., DEROSIER, D.J., VONDERVISZT, K., IMADA, K., NAMBA, K. The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. **Science.** 290: 2148-2152, 2000.

YONEKURA, K., YONEKURA, S.M., NAMBA, K. Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. **Res. Microbiol.** 153: 191-197, 2002.

ZIEG, J., SILVERMAN, M., HILMEN, M., SIMON, M. Recombination switch for gene expression. **Science.** 196: 170-172, 1977.

ZIEG, J. & SIMON, M. 1980. Analysis of the nucleotide sequence of an invertible controlling element. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 77: 4196-4200.

## **VIII) Anexos**

---



Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 808-1, sobre "CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS FLAGELARES DE *Escherichia coli* DE ORIGEM ANIMAL" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Domingos da Silva Leite está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 06 de abril de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 808-1, entitled "CHARACTERIZATION OF THE NEWS H ANTIGENS OF *Escherichia coli* FROM ANIMALS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on April 6, 2005.

Campinas, 06 de abril de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP