

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

mestrado

BC/50625

IB/ 81814

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Tatiana Amabile de Campos



**ESTRUTURA CLONAL E FATORES DE
COLONIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *Escherichia coli* DE
ORIGEM AVIÁRIA**

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>TATIANA AMABILE</i> <i>DE CAMPOS</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.

A handwritten signature in black ink, likely belonging to the supervisor.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do título de Mestre
em Genética e Biologia Molecular, Área de
Microbiologia.

Campinas, SP
2002

UNIDADE IB/1184
Nº CHAMADA T/UNICAMP
C157e
V EX
TOMBO BCI 50625
PROC 16-837102
C DA
PREÇO R\$ 11,00
DATA 28/08/02
Nº CPD

CM00172441-B

28/08/02

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

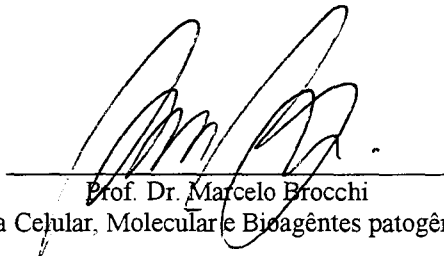
C157e **Campos, Tatiana Amabile**
Estrutura clonal e fatores de colonização de linhagens de
Escherichia coli de origem aviária/Tatiana Amabile Campos. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientador: Wanderley Dias da Silveira
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. *Escherichia coli*. 2. Patogenicidade. 3. Aves. I. Silveira,
Wanderley Dias da. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.



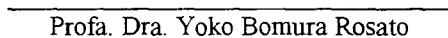
Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
Depto. de Microbiologia e Imunologia- IB/UNICAMP



Prof. Dr. Marcelo Brocchi
Depto. de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes patogênicos –FMRP- USP



Profa. Dra. M. Silvia Viccari Gatti
Depto. de Microbiologia e Imunologia – IB- UNICAMP



Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato
Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética- UNICAMP

*Aos meus pais M. Rita e Benedicto e
aos meus irmãos Téo, Thaís e Talita.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira pela oportunidade e orientação.

À Lia pelo auxílio na realização do teste de adesão em anéis de traquéia de aves.

À Profa Dra. Shirley Recco Pimentel e à Klélia pelo auxílio na realização dos cortes histológicos de traquéia.

Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, Antonia, Adriane e à Uyra Zama pelo auxílio nos testes de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Aos professores: Profª. Dra Maria Silvia V. Gatti, Prof. Dr. Antônio F. Pestana de Castro e Prof. Dr. Tomomasa Yano pela participação na banca prévia.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

Aos amigos de trabalho Luciana, Isildinha, Gustavo, Marcelo, Eliana, Gerson e, em especial, à Alessandra.

À Michela, Junia, Silvana e Michelle pela amizade.

Ao Egaz, em especial, pelo carinho, compreensão e incentivo.

A todas as pessoas que de alguma forma ajudaram a conduzir este trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- proc. n° 00/01881-0) pelo apoio financeiro.

Sumário

Resumo	01
Abstract	03
Introdução	04
Fímbria tipo 1	07
Fímbria P	09
Fímbrias “ <i>curli</i> ”	11
Hemaglutinina termo-sensível (Tsh)	12
Motilidade e diversidade genética de <i>fliC</i>	13
Objetivos	16
Material e Métodos	17
Material	17
1. Linhagens bacterianas	17
2. Meios de Cultura	18
2.1 Meio LB	18
2.2 Meio LA	18
2.3 Meio Mínimo	19
2.4 Meio CFA	19
2.5 Meio TSA	20
2.6 Meio Minca	20
2.7 Meio Eagle	21
3. Soluções	22
3.1 Solução de Hogness	22
3.2 Soluções utilizadas no teste de adesão em anéis de traquéia de aves	22
3.3 Soluções utilizadas no teste de microhemaglutinação	24
3.4 Soluções utilizadas para visualização de fímbrias e flagelos em microscopia eletrônica de transmissão	24
3.5 Soluções utilizadas na extração de DNA genômico	24

3.6 Soluções utilizadas na eletroforese e visualização do gel de agarose	27
Métodos	28
4. Teste de adesão em anéis de traquéia de embriões de aves	28
5. Teste de microhemaglutinação	29
6. Teste para verificação de expressão de flagelos (Motilidade)	30
7. Visualização de fimbrias e de flagelos em microscopia eletrônica de transmissão	30
8. Extração de DNA genômico	31
9. Amplificação genômica	32
10. Obtenção de RFLP (polimorfismo do fragmento de restrição do gene <i>fliC</i>)	35
Purificação do produto da amplificação do gene <i>fliC</i>	36
11. Teste de adesão em cultura de células HeLa e Hep-2 e teste de patogenicidade (LD ₅₀)	36
Resultados	37
1. Adesão em anéis de traquéia de embriões de aves	37
2. Teste de microhemaglutinação	39
3. Visualização de fimbrias em microscopia eletrônica de transmissão	52
4. Detecção dos genes <i>papA</i> , <i>fimA</i> , <i>crl</i> , <i>csgA</i> e <i>tsh</i> através de PCR	56
5. Teste de motilidade e visualização de flagelos em microscopia eletrônica de transmissão	67
6. Amplificação do gene <i>fliC</i>	70
7. Obtenção de RFLP do gene <i>fliC</i>	73
Discussão	82
Conclusões	91
Referências Bibliográficas	93

Lista de Tabelas

Tabela I: Origem e identificação das linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária.	17
Tabela II: Condições de reação de amplificação genômica	32
Tabela III: Iniciadores utilizados para a detecção dos genes <i>fimA</i> , <i>crl</i> , <i>csgA</i> , <i>papA</i> e <i>fliC</i> em linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária	33
Tabela IV: Ciclos de amplificação utilizados para a detecção dos genes <i>fimA</i> , <i>crl</i> , <i>csgA</i> , <i>papA</i> e <i>fliC</i> em linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária.	34
Tabela V: Condições da reação da digestão do gene <i>fliC</i> utilizadas para a obtenção de RFLP	35
Tabela VI: Microhemaglutinação, adesão em traquéia de aves e observação de fimbrias em microscopia eletrônica de transmissão para linhagens de <i>Escherichia coli</i> isoladas de aves saudáveis (N1 a N30), aves com septicemia (S1 a S24), aves com síndrome da cabeça inchada (SCI1 a SCI4, SCI6-SCI15) e de aves com onfalite (O1 a O11) cultivadas em meio TSA (1), meio LA (2), meio mínimo (3), meio CFA (4) e meio Minca (5).	50
Tabela VII. Padrões de Microhemaglutinação observados nas linhagens de <i>Escherichia coli</i> isoladas de aves cultivadas nos meios TSA, LA, mínimo, CFA e minca frente a eritrócitos bovinos, equinos, ovinos, humanos de cobaia e de galinha.	51
Tabela VIII: Detecção de genes para fimbria tipo 1, fimbria “ <i>curli</i> ”, fimbria P e hemaglutinina termo-sensível através da PCR em linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária.	60
Tabela XI: Frequência dos genes <i>papA</i> , <i>fimA</i> , <i>crl</i> , <i>csgA</i> e <i>tsh</i> entre linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária.	61
Tabela X. Motilidade e visualização de flagelos em microscopia eletrônica de transmissão (MET) de linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária após 18, 24, 48 e 72 horas de cultivo.	69
Tabela XI. Tamanho dos fragmentos amplificados do gene <i>fliC</i> , motilidade e expressão de flagelos das linhagens <i>fliC</i> + de linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária.	71

Tabela XII. Adesão em epitélio traqueal de aves, em cultura de células HeLa e Hep2 e patogenicidade das linhagens agrupadas no dendrograma obtido a partir dos perfis de RFLPs do gene *fliC*. 80

Tabela XIII: Adesão em células HeLa, Hep-2 e adesão em anéis de traquéia de embriões de aves de linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária isoladas de aves saudáveis (N1-N30), de aves com septicemia (S1-S24), originárias de aves com síndrome da cabeça inchada (SCI1-SCI4, SCI6-SCI15) e isoladas de aves com onfalite (O1-O11) na presença (c/m) e ausência (s/m) de D-manose (MR:adesão manose resistente; MS:adesão manose sensível; AA: adesão agregativa; DA: adesão difusa; LA: adesão localizada). 81

Lista de Figuras

Figura 1: Teste de adesão de linhagens <i>Escherichia coli</i> de origem aviária em epitélio de traquéia de embriões de aves.	38
Figura 2: Visualização de fimbrias da linhagem S13 de <i>Escherichia coli</i> isolada de ave com septicemia em microscopia eletrônica de transmissão.	54
Figura 3. Visualização de fimbrias (indicadas pelas setas) de linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária em microscopia eletrônica de transmissão	55
Figura 4. Gel de agarose (1,5%) com o produto de amplificação do gene <i>papA</i> (fimbria P) de linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária.	62
Figura 5. Gel de agarose (1,5%) com o produto de amplificação do gene <i>fimA</i> (fimbria tipo 1) de linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária.	63
Figura 6. Gel de agarose (1,5%) com o produto de amplificação do gene <i>crl</i> (fimbria “curli”) de linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária.	64
Figura 7. Gel de agarose (1,5%) com o produto de amplificação do gene <i>csgA</i> (fimbria “curli”) de linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária.	65
Figura 8. Gel de agarose (1,5%) com o produto de amplificação do gene <i>tsh</i> (hemaglutinina termo sensível) de linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária.	66
Figura 9 : Gel de agarose (1,5%) com o produto de amplificação do gene <i>fliC</i> (flagelina) de linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária.	72
Figura 10: Gel de agarose (1,5%) com os perfis de RFLP, obtidos a partir da digestão de <i>fliC</i> com a enzima <i>RsaI</i> , observados na linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária.	77
Figura 11: Gel de agarose (1,5%) com os perfis de RFLP, obtidos a partir da digestão de <i>fliC</i> com a enzima <i>RsaI</i> , observados na linhagens de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária.	78
Figura 12. Dendrograma gerado a partir do RFLP do gene <i>fliC</i> através da utilização do método UPGMA (POPEGENE 6.2)	79

Resumo

A estrutura clonal, a expressão de fimbrias e de flagelos foram analisadas em 49 linhagens de *Escherichia coli* associadas a diferentes tipos de doenças em aves (24 originárias de aves com septicemia, 14 linhagens isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada e 11 originárias de aves com onfalite), e em 30 linhagens isoladas de aves saudáveis (originárias da flora normal do trato gastrointestinal), para se verificar a relação destas estruturas com a patogenicidade bacteriana de APEC. A presença de fimbrias foi verificada através dos testes de adesão em epitélio traqueal de aves, microhemaglutinação frente a diferentes tipos de eritrócitos, visualização em microscopia eletrônica e detecção dos genes *fimA* (fimbria tipo 1), *papA* (fimbria P), *crl*, *csgA* (fimbrias “curli”) e *tsh* (hemaglutinina termo-sensível) através da reação da polimerase em cadeia (PCR). A expressão de flagelos foi verificada através do teste de motilidade e da observação da estrutura flagelar em microscopia eletrônica de transmissão. A presença de adesão manose sensível sugeriu que a fimbria tipo 1 pode mediar a ligação bacteriana ao epitélio de traquéia de aves enquanto que, a ocorrência de adesão manose resistente neste mesmo tecido demonstrou que outros tipos de adesinas podem estar envolvidas na colonização do trato respiratório das aves. Os resultados obtidos nos testes de microhemaglutinação e visualização de fimbrias em microscopia eletrônica demonstraram que um grande número de adesinas ainda não descritas podem ser encontradas na superfície das linhagens. A maior frequência dos genes *fimA*, *papA*, *crl*, *csgA* e *tsh* nas linhagens patogênicas (aproximadamente 90% nas linhagens originárias de aves com septicemia e síndrome da cabeça inchada, de 54,5% nas linhagens isoladas de aves com onfalite e de 30% nas linhagens da flora normal) sugeriu relação entre a presença dos mesmos e a patogenicidade bacteriana. A estrutura clonal obtida a partir da determinação dos perfis de RFPL do gene *fliC*, com o uso da enzima *RsaI*, permitiu o agrupamentos de grupos

clonais patogênicos, formados por linhagens com capacidade de adesão em epitélio de traquéia e de grupos clonais formados por linhagens patogênicas sem capacidade de adesão em epitélio de traquéia. Estes dados demonstram que a patogenicidade de *E. coli* de origem aviária resulta de processos multifatoriais que envolvem a presença de fimbrias e outros genes de virulência ainda não determinados.

Abstract

The clonal structure, fimbriae and flagella expression were analyzed in 49 *Escherichia coli* strains associated with different types of avian diseases (24 isolated from chickens with septicaemia, 14 from chickens with swollen head syndrome and 11 from chickens with omphalitis), and 30 from healthy chickens (gastrintestinal normal flora strains) to verify the relation of these structures with bacterial pathogenicity of APEC. The fimbriae presence was verified by the trachea epithelial adherence and hemagglutination assays, electron microscopy analysis and detection by PCR of genes *fimA* (type 1 fimbriae), *papA* (P fimbriae), *crl*, *csgA* (curli fimbriae) and *tsh* (thermo-sensitive hemagglutinin). The flagella expression was verified by the motility assays and electron microscopy analysis. The occurrence of mannose sensitive adherence suggested that type 1 fimbriae could mediate the bacterial attachment to the avian trachea epithelium and the mannose resistant adherence onto the same tissue showed that other adhesin types could be involved in bacterial colonization of avian upper respiratory tract. The results of hemagglutination assays and electron microscopy analysis showed that diverse adhesins could be found on the bacterial surface. The higher frequency of *fimA*, *papA*, *crl*, *csgA* and *tsh* genes (observed in 90% of septicaemic and swollen head syndrome avian strains, in 54,5% omphalitis strains and in 30% commensal avian strains) suggest the relationship of these genes to the bacterial pathogenicity of APEC. The clonal structure of the *fliC* gene was obtained by RFLP determination, with *RsaI* enzyme, and allowed the clustering of pathogenic strains having positive adherence and the clustering of pathogenic strains having negative adherence. These data suggest that the pathogenicity of avian *E. coli* results of multi-factorial processes that involve the occurrence of different strategies selected during the infections development.

Introdução

Apesar de *Escherichia coli* estar presente na microflora normal do trato intestinal de aves e de mamíferos, existem clones bacterianos de *E. coli* altamente adaptados que possuem fatores de virulência que os habilitam a causar um amplo espectro de doenças (*in*: Nataro e Kaper, 1998; *in*: Dho- Moulin e Fairbrother, 1999).

Em aves, linhagens patogênicas de *Escherichia coli* (denominadas APEC) estão freqüentemente associadas a infecções extra intestinais, principalmente do trato respiratório, ou a infecções sistêmicas que resultam em uma variedade de doenças responsáveis por severos prejuízos econômicos à indústria aviária (*in*: Dho-Moulin e Fairbrother, 1999).

Infecções do saco da gema por APEC são freqüentemente observadas após o período final de incubação do ovo, geralmente decorrentes de contaminação fecal de sua superfície, podendo resultar em mortalidade do embrião ou morte das aves jovens (até três semanas de idade). A permanência de infecções do saco da gema e onfalite também são doenças freqüentemente observadas. Entretanto, a síndrome mais importante associada com APEC inicia-se como uma infecção do trato respiratório superior, secundária a infecções com “Newcastle Disease Virus” (NDV), “Infectious Bonchitis Virus” (IBV) e/ ou *Mycoplasma gallisepticum* ou ainda devido à aplicação de vacinas para as estas viroses. Se não forem tratadas, as infecções do trato respiratório superior causadas por APEC podem evoluir para bacteremia e infecção generalizada (*in*: Dho-Moulin e Fairbrother, 1999).

A suscetibilidade das aves às infecções causadas por APEC aumenta devido à deciliação das células epiteliais do trato respiratório superior, seguida pela exposição à amônia e poeira contaminada presentes no ambiente imediato das aves. Em aves de postura, APEC pode infectar o oviduto via saco aéreo abdominal esquerdo levando à salpingite e perda da habilidade de

postura. Por outro lado, APEC pode, esporadicamente, invadir a cavidade peritoneal via oviduto levando à peritonite e morte. Em aves, APEC também pode causar síndrome da cabeça inchada que é caracterizada por celulite e edema dos tecidos faciais da pele e dos tecidos periorbitais (*in*: Dho-Moulin e Fairbrother, 1999).

Vários fatores de virulência já foram identificados em linhagens APEC. Dentre estes estão incluídas a habilidade de adesão ao epitélio do trato respiratório superior, resistência às defesas imunológicas do hospedeiro, multiplicação da bactéria em líquidos fisiológicos através da expressão de sideróforos, produção de hemolisinas, colicinas, toxinas e motilidade (Vidotto *et al.*, 1990; Fantinatti *et al.*, 1994; Vidotto *et al.* 1997; Silveira *et al.*, 1998; Parreira *et al.*, 1998; *in*: Dho- Moulin e Fairbrother, 1999; Knöbl *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2002).

A adesão mediada por fatores de colonização provavelmente representa uma função crítica no desenvolvimento de doenças bacterianas associadas à *E. coli* por possibilitar à mesma sua ligação e permanência nas superfícies epiteliais (Moon, 1990). Estruturas responsáveis pela adesão bacteriana são denominadas adesinas e podem estar organizadas como estruturas fimbriais (Moon, 1990) ou adesinas afimbriais (*in*: Mol e Oudega, 1996).

Segundo Isaacson (1985), qualquer estrutura presente na superfície celular bacteriana que medeia sua adesão a uma célula animal é uma adesina. Adesinas que ligam-se a eritrócitos são denominadas hemaglutininas. Apesar destas estruturas reconhecerem eritrócitos como células adequadas para interagir, provavelmente este tipo celular não é reconhecido na infecção natural do hospedeiro. Em alguns casos, os eritrócitos possuem receptores similares aos presentes nas células alvos (reconhecidas pelas bactérias) e, por isto, estas reações são utilizadas para caracterização inicial de adesinas bacterianas.

Fímbrias são filamentos de estruturas poliméricas, protéicas, localizadas na superfície das células bacterianas que apresentam propriedades adesivas específicas. Podem ser identificadas

sob análise em microscopia eletrônica, através da observação de suas capacidades hemaglutinantes testadas em experimentos de hemaglutinação e, também, através de sua identificação sorológica (Mooi e De Graaf, 1985; Moon, 1990; *in*: Mol e Oudega, 1996).

A expressão de estruturas fimbriais, assim como de outros fatores de patogenicidade bacteriana, varia em resposta às condições ambientais comuns que regulam a transcrição de diferentes operons. Em linhagens enteropatogênicas de *E. coli* a transcrição de operons fimbriais geralmente é reprimida em ambiente com alta osmolaridade e baixas temperaturas (Mooi e De Graaf, 1985; White-Ziegler *et al.*, 2000). Apesar disso, existem adesinas presentes na superfície de linhagens de *E. coli* aviária que expressam-se a 25°C e são reprimidas a 37°C (Olsén *et al.*, 1993; Provence e Curtiss III, 1994).

Diferentes tipos de fimbrias já foram identificados em linhagens patogênicas de origem aviária (Vidotto *et al.*, 1990; Fantinatti *et al.*, 1994; Marc e Dho-Moulin, 1996; Parreira *et al.*, 1998; Maurer *et al.* 1998; Marc e Arné, 1998; Vidotto *et al.*, 1999; La Ragione *et al.*, 1999, 2000; Stordeur *et al.*, 2002). A diversidade de adesinas encontradas na superfície bacteriana de linhagens patogênicas de *E. coli* de origem aviária demonstra que vários tipos de estruturas podem estar relacionadas à colonização bacteriana e à patogenicidade destas linhagens (Dho-Moulin *et al.*, 1990). As fimbrias tipo 1, tipo P, *curli* e TSH são adesinas que já foram identificadas e caracterizadas nessas (Olsén *et al.*, 1993; Provence e Curtiss III, 1994; Pourbakhsh *et al.*, 1997; Stathopoulos *et al.*, 1999).

Fímbria tipo 1

A fímbria tipo 1 possui capacidades adesivas que permitem à bactéria aderir às células epiteliais do trato respiratório superior (Wooley *et al.*, 1998; La Ragione *et al.*, 1999 ; 2000). Suas propriedades adesivas são bloqueadas por antisoros específicos e pelo carboidrato D-manose, receptor celular da fímbria tipo 1, característica que é utilizada em sua identificação (Moon, 1990; *in* :Mol e Oudega, 1996).

A fímbria tipo 1 consiste de uma subunidade protéica principal (FimA) associada com proteínas auxiliares (FimF, FimG) e com a adesina FimH. Estas subunidades são codificadas pelo grupo gênico *fim* pertencente ao “operon” *pil* localizado no cromossomo bacteriano. Os genes *fimA*, *fimF* e *fimG* codificam as subunidades estruturais da fímbria. Os genes *fimC* e *fimD*, por sua vez, participam da reunião das subunidades, enquanto *fimB* e *fimE* determinam a variação da fase fimbrial (Mol e Oudega, 1996). Devido à aglutinação D-manose resistente, observada em linhagens *pil*+, acredita-se que este “operon” também seja responsável pela expressão de outras fimbrias D-manose resistentes, além da fímbria tipo 1 (Vidotto *et al.*, 1997).

Apesar da presença da fímbria tipo 1 ser mais freqüente em linhagens patogênicas de *E. coli* aviária do que em não patogênicas, foi demonstrado que outros fatores de virulência são necessários à patogenicidade bacteriana. Estudos realizados *in vivo* por Pourbaksh *et al.* (1997) sugerem que a fímbria tipo 1 possivelmente está associada à colonização inicial do trato respiratório superior e que adesinas fimbriais P podem estar envolvidas no estabelecimento da população bacteriana nos órgãos mais profundos das aves. Experimentos realizados por Wooley *et al.* (1998) também sugerem que a fímbria tipo 1 é necessária à colonização inicial do trato respiratório superior, mas que fatores adicionais, como motilidade e produção de colicina ColV, resultariam no aumento da colonização e das lesões na traquéia.

Fímbria P

A adesina fimbrial P foi inicialmente descrita em linhagens de *E. coli* associadas a infecções do trato urinário superior de humanos (*in*: Mol e Oudega, 1996). É codificada pelos grupos gênicos *pap* e *prp*. O grupo gênico *pap*, localizado no cromossomo, compreende 11 genes que são responsáveis pela expressão do complexo fimbrial P. Os genes *papI* e *papB* são seqüências reguladoras responsáveis pela variação de fase da fimbria. O gene *papA* codifica a subunidade estrutural principal da fimbria P. O gene *papE* codifica a extremidade da subunidade fimbrial e o gene *papG* codifica a adesina fibrilar. Além dos genes citados anteriormente, existem seqüências genéticas (*papH*, *papJ*, *papF* e *papK*), que codificam proteínas necessárias à integridade da associação conformacional de todo o complexo fimbrial, e genes que codificam proteínas transportadoras das subunidades estruturais (*papD*) e proteínas que coordenam a reunião ordenada do complexo fimbrial P (*in*: Mol e Oudega, 1996; *in*: Dho-Moulin e Fairbrother, 1999).

A especificidade receptora da fimbria P é conferida pela adesina terminal *papG* que reconhece diferentes isoreceptores que contêm α -D-galactosil-(1-4)- β -galactopiranosídeo (dissacarídeo gal-gal) e é encontrada em 3 variantes moleculares (I, II e III) (Hoschützky *et al.*, 1989). A adesina *papGIII* aglutina eritrócitos de carneiros que apresentam glicolídeos de Forssman e eritrócitos humanos que contêm o digalactosídeo com o glicolípido gal-sialosil. A variante *papGII* aglutina eritrócitos humanos tipo P e de carneiros. A adesina *PapGI*, por sua vez, aglutina eritrócitos humanos tipo P e possui um variante molecular denominada *papGI'* que possui capacidade de aglutinação semelhante à *PapGIII* (Johnson *et al.*, 2001).

Linhagens patogênicas de *E. coli* isoladas de aves também expressam adesinas fimbriais P (Dozois *et al.*, 1995; Dozois *et al.*, 1996; Pourbaksh *et al.*, 1997; Vidotto *et al.*, 1997). Em geral,

estas adesinas são observadas em baixa frequência nas amostras estudadas (Dozois *et al.*, 1995;; Vidotto *et al.*, 1997). Dozois *et al.* (1996) observaram a expressão de adesinas P fimbriais somente em sorotipos O1 e O18 de *E. coli* septicêmicas para aves.

Análises genéticas do grupo gênico *pap* demonstraram que este grupo genético ocorre em proporções elevadas entre linhagens de *E. coli* aviária, apesar da expressão de fimbria P não ser freqüentemente observada entre linhagens de APEC (Dozois *et al.*, 1995; 1996). Dozois *et al.* (1996) encontraram seqüências *pap* em 31% das amostras septicêmicas analisadas. Contudo, análises com PCR e “Southern blot”, realizadas nestas amostras, demonstraram que somente as amostras que expressaram a adesina fimbrial P apresentaram cópias completas do grupo gênico *fel* (que codifica adesinas P fimbriais). Por outro lado, linhagens que não expressaram a fimbria P apresentaram seqüências divergentes ou parciais de *pap* que impossibilitam sua expressão.

A função da fimbria P na patogenicidade de *E. coli* de aves ainda não está elucidada. Através da realização de estudos *in vivo*, Pourbaklsh *et al* (1997) evidenciaram a variação da expressão das adesinas P fimbriais de acordo com a sua localização, sugerindo que as adesinas P fimbriais não são importantes na colonização inicial do trato respiratório superior mas sim nos estágios mais tardios da infecção. Estudos realizados com linhagens *pap*-, demonstraram que a adesão D-manose sensível em células de traquéia pode estar relacionada à expressão da fimbria tipo 1, representando o primeiro passo da colonização dos pulmões e saco aéreo, enquanto que a adesão D- manose resistente em epitélio traqueal deve-se a outra(s) fimbria(s), mas não à adesina fimbrial P (Dozois *et al.*, 1995; Vidotto *et al.*, 1997).

Fímbrias “*curli*”

Fímbrias “*curli*” são estruturas filamentosas finas e encaracoladas encontradas na superfície de *E. coli* e *Salmonella sp.*, que realizam a ligação da bactéria à matriz extracelular e proteínas séricas tais como fibronectina e laminina (Collinson *et al.*, 1993). São, também, responsáveis pela autoagregação e sedimentação bacteriana em culturas estáticas (Olsén *et al.*, 1993). Fatores de colonização “*curli*” são expressos *in vitro* a 26°C, na fase estacionária de crescimento e em meios com baixa osmolaridade (Maurer *et al.*, 1998; *in*: Dho-Moulin e Fairbrother, 1999).

Inicialmente acreditava-se que a subunidade estrutural da fimbria “*curli*” era codificada pelo gene *crl* (Olsén *et al.*, 1989), contudo, estudos realizados por Olsén *et al.* (1993), com linhagens de *E. coli* K12, mostraram que o gene *csgA* é responsável pela codificação da subunidade estrutural da *curlina* (monômero constituinte da fimbria “*curli*”).

Desde que análises de alinhamento de seqüências de aminoácidos da proteína *curlina* demonstraram que esta fimbria não apresenta homologia com subunidades protéicas de outras estruturas de superfície bacteriana, como pili ou flagelo, acredita-se que a biogênese de “*curli*” seja diferente daquelas presentes na superfície bacteriana apresentando, possivelmente, mecanismos de secreção distinto dos que já foram caracterizados em *E. coli* (Olsén *et al.*, 1993).

Os genes responsáveis pela expressão de “*curli*” na superfície bacteriana estão organizados em um operon denominado *csgBA* que é constituído por dois genes estruturais: *csgA* e *csgB* e vários genes reguladores. O gene *csgA* codifica a subunidade estrutural da fimbria (*curlina*) e *csgB* codifica um componente protéico que é requerido para estabilizar as proteínas CsgA (*curlina*) e organizá-las em estruturas fibrilares (Hammar *et al.*, 1995). Além disso, existem genes que participam da regulação da expressão das subunidades estruturais e da biogênese da

fimbria: os genes *csgE*, *csgF* e *csgG* são requeridos para exportar os monômeros de *curlina*, e o gene *csgD* é o ativador transcricional de *csgA* e *csgB* (Hammar *et al.*, 1995). Os dois operons estruturais ainda são regulados pelos genes *crl*, e todos os genes envolvidos na expressão de “*curli*” são regulados pelo fator sigma *rpoS* (Olsén, *et al.*, 1993; Hammar *et al.*, 1995).

Apesar de Maurer *et al.* (1998) encontrarem gene *csgA* entre todas as linhagens de *E. coli* isoladas de aves doentes analisadas por eles, a função da fimbria “*curli*” no processo de patogenicidade não está elucidada. Mutações no gene *csgA*, e subsequente colonização experimental em aves, podem fornecer informações sobre seu papel no desenvolvimento de infecções. Sabe-se que a produção de “*curli*” está relacionada à capacidade da bactéria autoagregar-se e ligar-se à fibronectina e laminina, podendo constituir uma vantagem seletiva à bactéria, permitindo a colonização da matéria orgânica no ambiente externo ao hospedeiro e, também, a colonização inicial do trato gastrointestinal. A função de “*curli*” pode ser a de adaptar *E. coli* ao meio ambiente, fora do trato digestivo, facilitando sua sobrevivência e provavelmente sua passagem entre hospedeiros (Olsén *et al.*, 1993).

Hemaglutinina termo-sensível (Tsh)

A atividade de hemaglutinação de eritrócitos de galinha, preferencialmente expressa a baixas temperaturas (26°C) e reprimida a 37°C e 42°C em APEC, é um fenômeno denominado hemaglutinação temperatura sensível (Provence e Curtiss III, 1994). O gene que codifica a hemaglutinina Tsh produz uma proteína de 140kDa que apresenta alta homologia às proteases de IgA de *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*, podendo apresentar atividade proteolítica e de hemaglutinação (Provence e Curtiss III, 1994; Stathopoulos *et al.*, 1999).

Estudos realizados por Stathopoulos *et al.* (1999) sugerem que Tsh é proteoliticamente processada durante sua maturação resultando em 2 proteínas: (i) uma proteína secretada de 106KDa (denominada Tsh_S) e, (ii) uma proteína da membrana externa de 33KDa (denominada Tsh_β). Observações de que a secreção de Tsh_S ocorre principalmente a 42°C (temperatura corporal das aves), e que a atividade de hemaglutinação ocorre somente em baixas temperaturas (26°C), sugerem que a forma não processada de Tsh é responsável pela atividade de hemaglutinação e que a secreção de Tsh_S ocorre no interior do hospedeiro.

A presença do gene *tsh* em 46% dos isolados clínicos de *E. coli* e sua completa ausência nos isolados de aves saudáveis sugere alguma relação com a patogenicidade de APEC (Maurer *et al.*, 1998). Infecções experimentais de galinhas com um derivado deletado isogênico *tsh* da linhagem de *E. coli* aviária χ 7122 demonstrou que Tsh contribui para a formação de lesões e deposição de fibrina no saco aéreo (Dozois *et al.*, 2000). Assim, a identificação de Tsh com atividade de hemaglutinação termo-sensível em eritrócitos de galinha (Provence e Curtiss III, 1994), sugere que esta estrutura pode atuar como uma adesina, particularmente nos estágios iniciais da infecção do trato respiratório de aves, apresentado-se como uma protease com substratos específicos no saco aéreo nos estágios posteriores da infecção (Dozois *et al.*, 2000).

Motilidade e diversidade genética de *fliC*

A motilidade, mediada por flagelos, possibilita à bactéria seu direcionamento a ambientes favoráveis, bem como sua evasão de ambientes adversos (Macnab, 1987). Acredita-se que a expressão de flagelos esteja também relacionada à patogenicidade bacteriana por favorecer a

adesão e invasão de células eucariotas (Finlay e Falkow, 1989; Allison *et al.*, 1992; Salyers e Whitt, 1994) estando, provavelmente, envolvida na colonização da traquéia de aves por *E. coli* (Allison *et al.*, 1992). Contudo, La Ragione *et al.* (2000a) propõem que o flagelo seja responsável pela penetração no muco pela bactéria, não sendo diretamente responsável pela adesão bacteriana às superfícies epiteliais.

A observação de que 62% das linhagens de *E. coli* isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada apresentaram motilidade sugere que, juntamente com a produção de colicinas e aerobactinas, a expressão de flagelos seja um dos fatores de virulência mais frequentes associado a esta síndrome (Parreira *et al.*, 1998). Estudos realizados com linhagens de *E. coli* de origem aviária mostraram que linhagens mutantes aflageladas apresentaram menor capacidade de colonização e invasão do que linhagens flageladas, sustentando a hipótese que a motilidade pode constituir um importante fator de virulência para a patogênese destas linhagens (La Ragione *et al.*, 2000b).

Além de estar relacionado à patogenicidade bacteriana, o flagelo também é utilizado como um dos principais métodos de sorotipagem de linhagens patogênicas de *E. coli*, que é baseado na presença de lipopolissacarídeo (O) e do antígeno flagelar (H) (Orskov *et al.*, 1975). A variabilidade do antígeno H é encontrada dentro do filamento flagelar, que é um polímero de uma única proteína (denominada flagelina) codificada pelo gene *fliC* (Kuwajima *et al.*, 1989). Sequenciamentos do gene *fliC* em linhagens patogênicas de *E. coli* com diferentes antígenos H, mostraram que as regiões N- e C- terminal (responsáveis pela secreção e polimerização da flagelina) dos alelos são altamente conservadas enquanto que a região central (produtora da porção antigênica exposta na superfície bacteriana) é muito polimórfica e altamente diversificada (Reid *et al.*, 1999). Análises de sequenciamento comparativo do gene *fliC* de *E. coli* revelaram que dois eventos de recombinação podem ser responsáveis pela variação antigênica: (i)

a transferência horizontal e posterior divergência de linhagens a partir de um ancestral comum e, (ii) eventos de recombinação intragênica que produzem um novo alelo com uma estrutura em mosaico (Reid *et al.*, 1999).

Por serem altamente conservados, os finais 5' e 3' do gene *fliC* constituem alvos para a síntese de iniciadores para a realização da PCR. As seqüências conservadas de cada final permitem a amplificação de uma variedade de alelos com a utilização de um único par de iniciadores. Além disso, o desenvolvimento de testes PCR-RFLP possibilita a diferenciação de grupos de antígenos flagelares entre linhagens patogênicas de *E. coli*, além de permitir verificar a ocorrência de clones bacterianos geneticamente relacionados, dentro de uma população estudada (Fields *et al.*, 1997). Somente em linhagens H7 já foram encontrados 62 sítios polimórficos, o que demonstra a grande variabilidade genética de *fliC* ocorrida dentro de um mesmo sorogrupo (Wang *et al.*, 2000).

Este estudo visou verificar a presença de fimbrias e de flagelos em 79 linhagens de *Escherichia coli* isoladas de aves (30 linhagens isoladas de aves saudáveis, 24 originárias de aves com septicemia, 14 linhagens isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada e 11 originárias de aves com onfalite) e a ocorrência de clones bacterianos geneticamente relacionados através da comparação do RFLP do gene *fliC*. A obtenção da estrutura clonal da população em estudo, juntamente com a observação da ocorrência de fimbrias e de flagelos, foram utilizados para verificar a possível relação destas estruturas com o desenvolvimento das diferentes patologias em que as linhagens estão associadas.

Objetivos

(i) Verificar a expressão de fimbrias e/ou adesinas presentes em linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária através de:

- teste de adesão em epitélio de traquéia de embriões de aves,
- teste de microhemaglutinação,
- visualização da morfologia das fimbrias em Microscopia Eletrônica de Transmissão,
- detecção dos genes *fimA* (fimbria tipo 1), *crl* (gene regulador de *curli*), *csgA* (gene estrutural de *curli*), *papA* (gene estrutural da fimbria P) e *tsh* (gene estrutural da hemaglutinina TSH) e sua correlação com as capacidades de adesão e hemaglutinação apresentados pelas diferentes linhagens;

(ii) Verificar a ocorrência de motilidade e expressão de flagelos através do teste de motilidade e visualização de flagelos em microscopia eletrônica de transmissão e da amplificação por PCR do gene *fliC*;

(iii) Obter a estrutura clonal da população bacteriana em estudo através da determinação do perfil de RFLP do gene *fliC* após digestão com enzima de restrição;

(iv) Correlacionar os dados acima com os diferentes tipos de doenças associadas às linhagens em estudo, assim como com os possíveis genes de patogenicidade apresentados pelas mesmas.

Material e Métodos

Material

1. Linhagens Bacterianas

Neste estudo foram analisadas 79 linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária sendo 30 isoladas de aves sadias (N1-N30), 24 linhagens isoladas de aves septicêmicas (S1-S24), 14 linhagens provenientes de aves com síndrome da cabeça inchada (SCI1-SC4, SCI6-SCI15) e 11 linhagens isoladas de aves com onfalite (O1-O11). A identificação de cada linhagem bacteriana está relacionada na Tabela I:

Tabela I: Origem e identificação das linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária.

Linhagem	Origem	Linhagem	Origem
N1	Flora intestinal de aves	S11	Aves septicêmicas
N2	Flora intestinal de aves	S12	Aves septicêmicas
N3	Flora intestinal de aves	S13	Aves septicêmicas
N4	Flora intestinal de aves	S14	Aves septicêmicas
N5	Flora intestinal de aves	S15	Aves septicêmicas
N6	Flora intestinal de aves	S16	Aves septicêmicas
N7	Flora intestinal de aves	S17	Aves septicêmicas
N8	Flora intestinal de aves	S18	Aves septicêmicas
N9	Flora intestinal de aves	S19	Aves septicêmicas
N10	Flora intestinal de aves	S20	Aves septicêmicas
N11	Flora intestinal de aves	S21	Aves septicêmicas
N12	Flora intestinal de aves	S22	Aves septicêmicas
N13	Flora intestinal de aves	S23	Aves septicêmicas
N14	Flora intestinal de aves	S24	Aves septicêmicas
N15	Flora intestinal de aves	SCI1	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N16	Flora intestinal de aves	SCI2	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N17	Flora intestinal de aves	SCI3	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N18	Flora intestinal de aves	SCI4	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N19	Flora intestinal de aves	SCI6	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N20	Flora intestinal de aves	SCI7	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N21	Flora intestinal de aves	SCI8	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N22	Flora intestinal de aves	SCI9	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N23	Flora intestinal de aves	SCI10	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N24	Flora intestinal de aves	SCI11	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N25	Flora intestinal de aves	SCI12	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N26	Flora intestinal de aves	SCI13	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N27	Flora intestinal de aves	SCI14	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N28	Flora intestinal de aves	SCI15	Aves com Síndrome da cabeça inchada
N29	Flora intestinal de aves	O1	Aves com onfalite
N30	Flora intestinal de aves	O2	Aves com onfalite
S1	Aves septicêmicas	O3	Aves com onfalite
S2	Aves septicêmicas	O4	Aves com onfalite
S3	Aves septicêmicas	O5	Aves com onfalite
S4	Aves septicêmicas	O6	Aves com onfalite
S5	Aves septicêmicas	O7	Aves com onfalite
S6	Aves septicêmicas	O8	Aves com onfalite
S7	Aves septicêmicas	O9	Aves com onfalite
S8	Aves septicêmicas	O10	Aves com onfalite
S9	Aves septicêmicas	O11	Aves com onfalite
S10	Aves septicêmicas		

2. Meios de cultura

2.1 LB (Luria Bertani) (Miller, 1972)

Triptona.....	10,00g
NaCl.....	10,00g
Extrato de Levedura	5,00g
H ₂ O destilada q.s.p.....	1000,00mL

Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121,6°C durante 20 minutos.

2.2 LA (Luria Bertani – Ágar)

Para o preparo de meio sólido LA foram adicionados 1,5g de ágar para cada 100mL de meio LB. Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121,6°C durante 20 minutos.

2.3 Meio Mínimo (Sambrook *et al.*, 1989)

Solução estoque de sais para Meio Mínimo concentrada 20X

KH ₂ PO ₄	60,00g
K ₂ HPO ₄	14,00g
(NH ₄) ₂ SO ₄	20,00g
Citrato de Sódio	10,00g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,00g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00mL

A solução de sais de Meio Mínimo foi esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,22µm e armazenada a 4°C. Foram autoclavados (121,6°C durante 20 minutos) 2g de ágar em 100mL de água destilada sendo, após o resfriamento, adicionados 5mL de Sais de Meios Mínimo e 2,5mL de glicose 20% previamente filtrada.

2.4 Meio CFA (Evans *et al.*, 1980)

Solução de sais para CFA

MgSO ₄ .7H ₂ O.	0,50g
H ₂ O destilada.....	50,00mL
MnCl ₂ .7H ₂ O	0,39g
H ₂ O destilada.....	50,00mL

As soluções foram misturadas, filtradas em membrana Millipore 0,22µm e armazenadas a 4°C.

Meio Base

Extrato de Levedura	1,50g
Casaminoácidos	10,00g
Agar bacterológico	20,00g
H ₂ O	1000,00mL

Foi adicionado 1mL da solução de sais para CFA, em condições de assepsia em cada 100mL de meio base resfriado após a esterilização em autoclave (121,6°C por 20 minutos).

2.5 Meio TSA (Trip-case Soy Agar)

Ágar bacteriológico.....	15,00g
TSB.....	50,00g
H ₂ O destilada q. s. p.....	1000,00mL

Após o preparo o meio de cultura foi esterilizado em autoclave (121,6°C por 20 minutos).

2.6 Meio Minca (Guiné *et al.*, 1977)

Meio Base

Extrato de Levedura	1,00g
Casaminoácidos	1,00g
KH ₂ PO ₄	1,36g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O.	10,10g
Ágar bacterológico	12,00g
H ₂ O destilada.....	1000,00mL

O meio base foi esterilizado em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Após o seu resfriamento, foi adicionado 1mL da solução de sais de Minca para cada 100mL de meio base.

Solução de sais de Minca

MgSO ₄ .7H ₂ O	1,000g
MnCL ₂ .4H ₂ O	0,100g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,013g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,040g
H ₂ O q.s.p.....	100,00mL

A solução de sais de Minca foi esterilizada através de filtração em membrana Millipore 0,22µm e armazenada a 4°C.

2.7 Meio Eagle

O meio de cultura Eagle utilizado foi o da formulação fornecida pela Nutricell ®.

3. Soluções

3.1 Solução de Hogness

K_2HPO_4	6,30g
$Na_3C_6H_5O_2H_2O$	0,45g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,09g
$(NH_4)_2 SO_4$	0,90g
KH_2PO_4	1,80g
Glicerol.....	44,00mL
H_2O deionizada q.p.s.....	100,00mL

Após o preparo a solução foi esterilizada sob vapor fluente durante 30 minutos. Foram utilizados 400 μ L de solução de Hogness e 400 μ L de meio LB inoculado com cada cepa bacteriana para a realização de estoque (mantido a -70°C).

3.2 Soluções utilizadas no teste de adesão em anéis de traquéia de aves

PBS 0,05M pH7,2

$K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	1,15g
KH_2PO_4	0,20g
KCl	0,20g
NaCl.....	8,00g

KH_2PO_4 foi dissolvido em cerca de 20 mL de água destilada e utilizado para o ajuste de pH do tampão. Após o preparo, a solução foi esterilizada através de autoclavação a 120°C durante 20 minutos e armazenada a 4°C até a utilização.

Solução Salina 0,85%

NaCl0,85g
H₂O destilada.....100,00mL

Após preparo, a solução foi esterelizada sob autoclavação durante 20 minutos a 121°C e armazenada a 4 °C.

Solução de D- manose 10%

D-manose.....10,00g
H₂O q.s.p. destilada.....100,00mL

A solução foi esterilizada através de membrana Millipore 0,22µm, aliquotada e armazenada a -20°C.

Solução estoque de corante Giemsa

Foi adicionado 1g do corante Giemsa em 54mL de glicerina. Esta solução permaneceu em banho maria a 60°C durante 90 minutos. Após resfriamento foram adicionados 84mL de metanol. Para a realização da coloração em lâminas, a solução estoque foi diluída 1:5 em Tampão de Sörensen, filtrada em papel de filtro e armazenada em frasco escuro a 4 °C.

Tampão de Sörensen pH7,3

Solução A
KH₂PO₄9,08g
H₂O q.s.p1000,0mL
Solução B.....9,47g
H₂O q.s.p.....1000,0mL

Para obter pH 7,3 foram misturados 23,2mL da solução A e 76,8mL da solução B.

3.3 Soluções utilizadas no teste de microhemaglutinação

O preparo das soluções de PBS e solução salina 0,85% foi descrito na seção 3.2.

3.4 Soluções utilizadas para visualização de fimbrias e flagelos em microscopia eletrônica de transmissão

Solução de Ácido fosfotúngstico (PTA) 1%

Ácido fosfotúngstico.....1,00g

H₂O deionizada esterilizada100,00mL

Após o preparo a solução foi armazenada em frasco escuro à temperatura de 4°C.

Solução de Formvar

Formvar.....0,40g

Clorofórmio.....10,00mL

A solução foi preparada em ambiente isento de umidade e armazenada à temperatura ambiente.

3.5 Soluções utilizadas na extração de DNA genômico

Lisozima

Lisozima.....1,00g

H₂O deionizada.....10,00mL

A solução foi filtrada em membrana Millipore 0,22µm e estocada à temperatura de -20°C.

Proteinase K

Proteinase K.....1,00g

H₂O deionizada.....10,00mL

A solução foi filtrada e armazenada à temperatura de -20°C.

RNase

RNase0,50g

H₂O deionizada10,00mL

Após esterilização, em vapor fluente durante 20 minutos, a solução foi aliquotada e armazenada a -20°C.

Clorofórmio-álcool isoamílico (24:1)

Clorofórmio.....240,00mL

Álcool isoamílico.....10,00mL

Após o preparo a solução foi armazenada a 4°C.

Tampão Tris-EDTA pH 8,0 (TE pH 8,0)

Para o preparo do tampão Tris-EDTA, o tampão Tris-HCl pH 8,0 foi utilizado a uma concentração final de 10,0mM e EDTA à concentração final de 1,0mM.

Solução de Tris - HCl (pH 8,0) 1M

121,1g de Tris-base foram adicionados a 800mL de água destilada e 42mL de ácido clorídrico concentrado. Água destilada foi adicionada até atingir o volume total de 1000mL.

Solução de EDTA (pH 8,0) 0,5M

86,1g de EDTA dihidratado foram misturados em 800mL de água destilada. Após agitação vigorosa o pH foi ajustado com solução 10N de hidróxido de sódio.

A solução foi distribuída em pequenas alíquotas, autoclavada a 120°C por 20 minutos e armazenada a -20°C.

CTAB (“Hexadecyltrimethyl-Amonium-Bromide”) NaCl (0,25M)

8,0 g de brometo de cetramônio e 4,1 g de NaCl foram dissolvidos em 80mL de água deionizada pré-aquecida a 65°C. Após estes procedimentos, o volume foi completado a 100mL com água deionizada a 65°C e a solução foi estocada à temperatura ambiente.

NaCl 5M

NaCl292,20g

H₂O q.s.p.....1000,00mL

Após o preparo a solução foi armazenada à temperatura de 4°C.

Tampão de Ressuspensão de DNA

Os corantes azul de bromofenol e xileno cianol foram adicionados na concentração final de 0,25%, para cada um dos corantes, a um solução de sacarose 50%. Após o preparo a solução foi estocada a 4°C.

3.6 Soluções utilizadas na eletroforese e visualização do gel de agarose

Tampão Tris - Borato - EDTA (TEB) 5X

Tris-base.....	54,00g
Ácido bórico.....	27,50g
Solução de EDTA 0,5M.....	20,00mL
H ₂ O destilada q.s.p.....	1000,00mL

Após o preparo a solução foi estocada à temperatura de 4°C.

Suspensão de Agarose a 1,5%

Agarose.....	1,20g
Tampão TEB 1X pH8,0	80,00mL

Para o preparo do gel de agarose, a solução foi aquecida em forno microondas até a dissolução completa da agarose, resfriada e colocada em cuba de eletroforese horizontal.

Solução corante de brometo de etídio (0,5µg/mL)

Brometo de etídio 1%.....	0,05mL
H ₂ O destilada q.s.p.	100,00mL

Métodos

4. Teste de adesão em anéis de traquéia de embriões de aves

O teste de adesão em anéis de traquéia de aves foi realizado como descrito por Dozois *et al.* (1995), com modificações.

Cortes de 5mm de espessura foram realizados em anéis de traquéia retirados de embriões de aves com 18 a 21 dias de idade. Após a retirada do muco por lavagem com PBS pH 7,2, os segmentos cortados foram colocados em microplacas contendo 25µL de meio Eagle com 5% de soro bovino fetal (SFB), na ausência e presença de D-manose (1%).

Uma suspensão de 50µL das amostras bacterianas (10^9 células/mL) cultivadas em 4mL de LB a 37°C foi adicionada aos anéis de traquéia e estes foram levemente homogeneizados e incubados durante 6 horas a 37°C. A seguir, os anéis de traquéia foram fixados em formol tamponado (PBS pH7,2 –formalina 10%) durante 24 horas, desidratados em etanol (seguindo-se a série: etanol 70%, 80%, 90%, 95% 100%) e diafanizados em álcool-xilol, xilol I e xilol II. Os anéis de traquéia foram mantidos durante 30 minutos em cada solução de desidratação e diafanização. Os segmentos de traquéia foram emblocados em banhos de PARAPLAST® a 60°C. Cortes histológicos de 5µm foram fixados em lâminas tratadas com ovoalbumina. Este material foi, então, hidratado (seguindo-se a série xilol II, xilol I, xilol-álcool, etanol 100%, 95%, 90%, 80% e 70% por 15 minutos em cada solução) e corado com Giemsa 20% durante 10 minutos. Após 18 horas as lâminas foram tratadas com xilol por 10 minutos sendo, a seguir, as laminulas adicionadas e fixadas com Entellan (Merck).

5. Teste de microhemaglutinação

A partir de um pré-inóculo de 18 horas, a 37°C em 4mL de LB, as linhagens bacterianas foram cultivadas nos meios TSA, LA, Mínimo, CFA e Minca por 24 horas a 37°C.

No teste de microhemaglutinação (Evans *et al.*, 1980) foram utilizados eritrócitos humanos (tipo O), bovinos, equinos, ovinos, de cobaia e de galinha. Para a separação das hemácias, cada tipo de sangue foi centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm. Os eritrócitos foram lavados duas vezes em solução salina 0,85% sob centrifugação (10 minutos a 2000 rpm). Parte destes foram lavados em PBS e o restante foi lavado com PBS acrescido de 0,5% de D-manose. Após a lavagem, os eritrócitos foram ressuspensos na concentração de 1,5% em PBS, acrescidos ou não de 0,5% de D-manose.

Para a realização do ensaio de microhemaglutinação, foram utilizadas placas de microtítulo de fundo côncavo. Foram adicionados 100µL de PBS ou PBS acrescido de 0,5% de D-manose na primeira fileira de cada placa e 50µL do mesmo tampão nas fileiras restantes para se obter diluições em série de razão 2. Com um palito esterilizado fez-se um raspado da cultura da amostra a ser testada e diluiu-se este raspado na primeira concavidade, até a última, desprezando-se os 50µL da amostra a ser testada. A seguir, foram adicionados 50µL de cada eritrócito a ser testado. As placas de microtítulo foram, então, levemente agitadas e incubadas a 4°C durante um período de no mínimo 1 hora. A seguir, foi realizada a leitura do ensaio de microhemaglutinação, onde as hemácias que formavam uma rede depositada no fundo da concavidade indicavam reação positiva para aquela concentração de bactérias. Considerou-se teste positivo aquele em que a formação da rede depositada foi superior a uma diluição maior ou igual a 1:8. Onde houve depósito de hemácias, sob a forma de botão, o teste foi considerado negativo.

6. Teste para verificação da expressão de flagelos (motilidade)

Cada linhagem bacteriana foi inoculada com uma agulha em um tubo de ensaio contendo 7 mL de LA 0,3% e incubada a 37°C. Os tubos foram, então, observados por 18 horas, 24 horas e 72 horas após a realização do inóculo. As amostras bacterianas que turvaram o tubo de cultura foram positivas para motilidade. Por outro lado, as linhagens que cresceram apenas no local do inóculo foram consideradas negativas para o teste de motilidade.

7. Visualização de fímbrias e flagelos em Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a visualização em microscopia eletrônica, a linhagem S13 foi cultivada em diferentes meios sólidos (LA, TSA, CFA, Minca e Mínimo) e líquidos (LB, TSB, CFA, Mínimo e Minca) a 37°C durante 18 horas. Pelo fato das linhagens bacterianas terem sido cultivadas em meio LB para o teste de adesão em anéis de traquéia de embriões de aves, e tendo em vista que a linhagem S13 apresentou fímbrias quando cultivada neste meio (Figura 2), optou-se pelo cultivo das demais linhagens em LB (37°C por 18 horas) para a visualização em microscopia eletrônica.

Para a observação em micoroscopia eletrônica, um raspado da cultura bacteriana cultivada em meio sólido foi cuidadosamente ressuspensas em 200µL de solução salina 0,85%. As amostras cultivadas em meio líquido, por outro lado, foram centrifugadas durante 30 segundos a 12000g e cuidadosamente ressuspensas em 200µL de solução Salina 0,85%.

Uma tela de níquel para Microscopia Eletrônica “mesh” 400, coberta com Formvar foi despositada, por 1 minuto, sobre uma gota de cada suspensão bacteriana (com a superfície da

cobertura de Formvar em contato com a suspensão) colocada sobre uma superfície de papel Parafilme. A seguir, a tela foi seca com papel absorvente e depositada novamente com a superfície coberta com Formvar sobre uma gota de PTA a 1% durante 30 segundos. Após 24 horas, as telinhas foram secas em Evaporador de Carbono e observadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (modelo LEO 906) (Sperandio e Silveira, 1993).

8. Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico das linhagens bacterianas foi realizada conforme descrito por Ausubel *et al.* (1988).

Para a extração do DNA genômico, as linhagens foram cultivadas em 4mL de LB a 37°C por 18 horas. A suspensão celular foi centrifugada (3 minutos a 12000 g) e o precipitado lavado duas vezes com o tampão Tris-EDTA pH 8,0 (TE), através de centrifugação a 12000g por 1 minuto. Ao precipitado seco foram adicionados 50 µL de lisozima (10mg/mL) e 10 µL de RNase (5mg/mL). A suspensão foi homogeneizada em vórtex e incubada a 37°C durante duas a três horas. Após este período, foi adicionada uma mistura de 70µL de SDS 10% e 5µL de proteinase K a 10mg/mL. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e incubada a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 100µL de NaCl 5M e a mesma quantidade de uma solução pré-aquecida a 65°C de CTAB/NaCl. A suspensão foi agitada em vórtex até a formação de um líquido de aspecto leitoso e incubada a 65°C durante mais 10 minutos. Após este processo, foram adicionados 750µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), sendo a mistura agitada em vórtex por 10 segundos. O material foi centrifugado por 5 minutos a 12000g e o sobrenadante aquoso cuidadosamente transferido para outro tubo. O DNA foi precipitado com 0,6 volumes de

isopropanol a -20°C e a mistura mantida a -20°C durante 30 minutos. Após este período, a solução foi centrifugada a 12000g por cinco minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado por centrifugação (12000g por 5 minutos) com etanol 75% a -20°C . O DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspensão cuidadosamente em tampão TE. A dosagem de DNA foi realizada a partir da leitura em espectrofotômetro a de 260nm e 280nm, de acordo com Sambrook *et al* (1989).

9. Amplificação genômica

A amplificação dos genes *fimA*, *papA*, *crl*, *csgA* e de *fliC* foi realizada de acordo com as especificações do fabricante da enzima Taq polimerase (GIBCO BRL®), que estão descritas a seguir.

Tabela II: Condições de reação da amplificação genômica

Componentes da reação de amplificação	Concentração final	Volumes utilizados para amplificação de <i>fimA</i> , <i>crl</i> , <i>csgA</i> e <i>papA</i>	Volumes utilizados para amplificação de <i>fliC</i>
Tampão 10X	1X	5,0 μL	10 μL
DNTPs	0,2mM de cada DNTP	1,0 μL (solução estoque de DNTPs com 0,2mM de cada DNTPs)	2,0 μL (solução estoque de DNTPs com 0,2mM de cada DNTPs)
MgCl ₂	1,5mM	1,5 μL	3,0 μL
Iniciadores	0,5 μM	1,0 μL	2,0 μL
DNA	----	5,0 μL	7,0 μL
Enzima Taq DNA polimerase (5U/ μL)	2,5U	0,5 μL	0,5 μL
Água deionizada esterilizada	Até completar o volume final	Até completar 50 μL	Até completar 100 μL

Os iniciadores utilizados na reação de amplificação genômica estão descritos na tabela a seguir:

Tabela III: Iniciadores utilizados para a detecção dos genes *fimA*, *crl*, *csgA*, *papA* e *fliC* em linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária

Iniciadores (5'-3')	Tamanho esperado do fragmento amplificado (pb*)	Referência
<i>fimA</i> <i>fimA05</i> 5'-GTTGATCAAACCGTTCAG-3'	331	Marc <i>et al.</i> , 1996
<i>fimA16</i> 5'-AATAACGCGCCTGGAACG-3'		
<i>csgA</i> <i>M464</i> 5'-ACTCTGACTTGACTATTACC-3'	200	Maurer <i>et al.</i> , 1998
<i>M465</i> 5'-AGATGCAGTTCTGGTCAAC-3'		
<i>crl</i> <i>M571</i> 5'-TTTCGATTGTCTGGCTGTATG-3'	250	Maurer <i>et al.</i> , 1998
<i>M570</i> 5'-CTTCAGATTCAGCGTCGTC-3'		
<i>tsh</i> <i>M74</i> 5'-GGGAATGACCTGAATGCTGG-3'	420	Maurer <i>et al.</i> , 1998
<i>M75</i> 5'-CCGCTCATCAGTCAGTACCAC-3'		
<i>papA</i> <i>pap1</i> 5'-GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG-3'	328	Vidotto <i>et al.</i> , 1997
<i>pap2</i> 5'-ATATCCTTTCTGCAGGGGATGCAATA-3'		
<i>fliC</i> <i>fliC1</i> 5'-ATCGCACAAGTCATTAATACCCAAC-3'	variável	Fields <i>et al.</i> , 1997
<i>fliC2</i> 5'-CTAACCCTGCAGCAGAGACA-3'		

* pares de base

Os ciclos utilizados para a amplificação de cada gene alvo estão descritos na tabela a seguir:

Tabela IV: Ciclos de amplificação utilizados para a detecção dos genes *fimA*, *crl*, *csgA*, *papA* e *fliC* em linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária.

Gene	“Hot start”	Denaturação	Anelamento	Extensão	Nº de ciclos	Extensão final
<i>fimA</i>	10min. -94°C	1 min. - 94°C	1min.-51,5°C	1 min. - 72°C	30	10min. - 72°C
<i>csgA</i>	10min. - 94°C	1 min. - 94°C	1min.-52°C	1 min. - 72°C	30	10min. - 72°C
<i>crl</i>	10min. - 94°C	1 min. - 94°C	1min.-54°C	1 min. - 72°C	30	10min. - 72°C
<i>papA</i>	10min. - 94°C	1 min. - 94°C	1min. -65°C	1 min. - 72°C	30	10min. - 72°C
<i>tsh</i>	10min - 94°C	1 min. -94°C	1min. - 61°C	1 min. - 72°C	30	10min. - 72°C
<i>fliC</i>	4min. - 95°C	30secs - 95°C	1 min. 59°C	2 min. - 72°C	35	10min. - 72°C

10 µL do volume de cada reação foram analisados através de eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% (submerso em tampão TEB 1X). Após a eletroforese, o gel foi colocado em uma cuba com solução de brometo de etídio, previamente diluído em água destilada (100µL para 100mL de água). Após 30 minutos, o gel foi visualizado em luz ultra-violeta em câmara escura.

10. Obtenção de RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição) a partir do produto de amplificação do gene *fliC*

A obtenção de RFLP do gene *fliC* foi realizada conforme sugerido por Fields *et al.* (1997). O produto da amplificação do gene *fliC*, previamente purificado, foi digerido com a enzima de restrição *Rsa I* de acordo com as especificações da GIBCO que estão descritas a seguir:

Tabela V: Condições da reação da digestão do gene *fliC*, utilizadas para a obtenção de RFLP

Componentes da reação	Concentração final	Volumes utilizados
Tampão da enzima <i>RsaI</i> 10X	1X	2µL
Enzima <i>RsaI</i> 10U/µL	1U	0,2µL
Fragmento amplificado (<i>fliC</i>)	1µg	10µL
Água deionizada esterilizada	-----	Até completar o volume de 20µL

20µL da reação de digestão enzimática de *fliC* foram analisados em eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% (submerso em tampão TEB 1X) e visualizados através da adição de brometo de etídio. Após a eletroforese, o gel foi colocado em uma cuba com solução de brometo de etídio previamente diluído em água destilada (100µL para 100mL de água). Após 30 minutos, o gel foi visualizado em luz ultra-violeta em câmara escura.

Os perfis de RFLP de cada linhagem foram comparados entre si e a partir destes dados foi obtido o dendrograma da população em estudo (através da utilização do Software POPGENE versão 3.2).

Purificação do produto da amplificação do gene *fliC*

Para a purificação do produto da amplificação do gene *fliC* foi adicionado ao DNA a ser precipitado NaCl 5M para uma concentração final de 200mM em 100µL de DNA amplificado e 250µL de etanol 100% a -20°C. Após 30 minutos a -20°C este material foi centrifugado por 5 minutos a 12000 g e lavado duas vezes, sob centrifugação (1 minuto a 12000g) com etanol 70% a -20°C. O material foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em água deionizada esterilizada.

11. Teste de adesão em cultura de células HeLa e Hep-2 e teste de patogenicidade (LD₅₀).

Embora não realizados neste estudo, ocorrência de adesão em cultura de células HeLa e Hep-2 e a LD₅₀ foram verificadas nas linhagens bacterianas (Silveira *et al.*, 2002). Os resultados obtidos neste teste foram analisados juntamente com os dados observados no presente estudo.

O teste de LD₅₀ foi utilizado como indicador de patogenicidade. Linhagens que apresentaram LD₅₀ maior que 10¹⁰ U.F.C/mL foram consideradas não patogênicas.

Resultados

1. Adesão em anéis de traquéia de embriões de aves

A adesão em anéis de traquéia de aves (Figura 1) foi considerada negativa quando as linhagens de *Escherichia coli* não se encontravam em contato com o epitélio da traquéia e positiva quando as linhagens bacterianas apresentaram-se em contato com epitélio traqueal, seja sobre os cílios, seja em regiões onde não existiam cílios. Do total das linhagens estudadas, 45 (57%) apresentaram adesão em epitélio traqueal de aves. Destas 45 linhagens, 20 linhagens (44%) apresentaram adesão manose sensível e 25 linhagens (55%) exibiram adesão manose resistente (Tabelas VI e XIII).

A adesão manose resistente em anéis de traquéia foi observada em dez das 30 linhagens originárias de aves saudáveis (33,3%), oito linhagens das isoladas de aves septicêmicas (33,3%), seis das 14 linhagens isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada (43%) e em apenas uma linhagem isolada de aves com onfalite (9%). A adesão do tipo manose sensível, por outro lado, apresentou-se em dez das 30 linhagens isoladas de aves saudáveis (33,3%), em três das linhagens originárias de aves com septicemia (12,5%), quatro das 14 linhagens isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada (28,5%) e em três das linhagens originárias de aves com onfalite (27,2%).

A adesão negativa foi observada em dez das linhagens isoladas da flora normal de aves (33,3%), em 12 das linhagens isoladas de aves septicêmicas (50%) e em quatro das linhagens originárias de aves com síndrome da cabeça inchada (28,5%). Sete das linhagens originárias de aves com onfalite (65%) não aderiram em epitélio traqueal de aves.

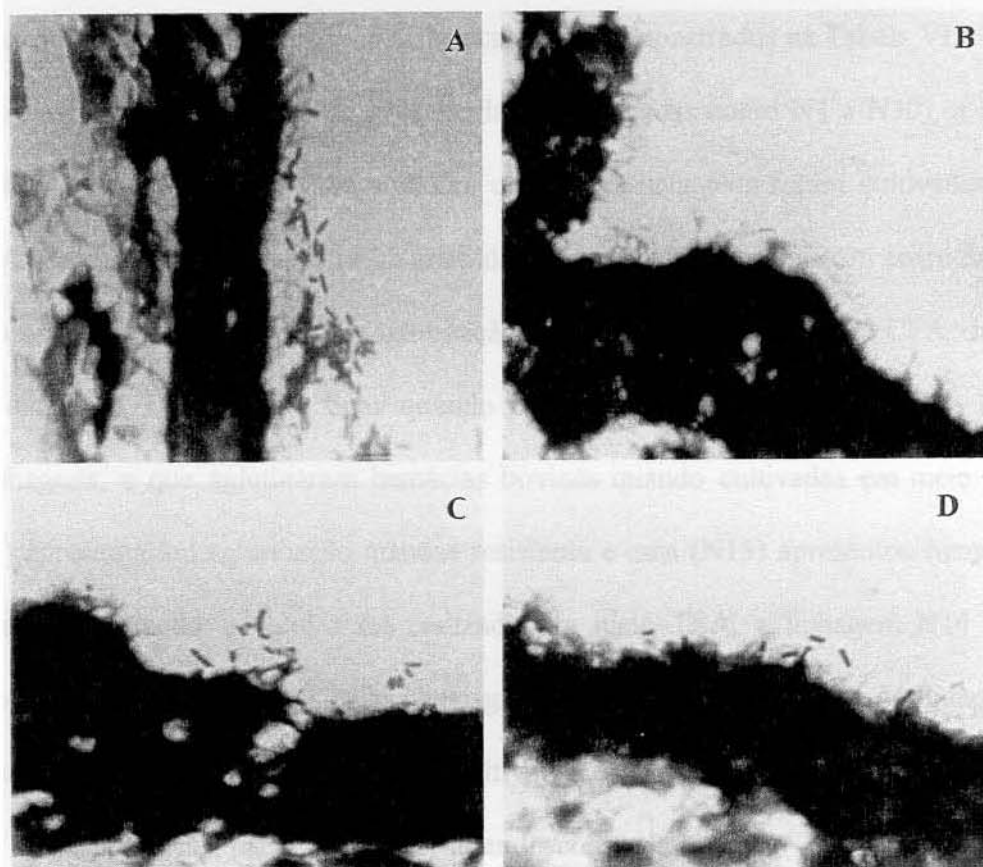


Figura 1: Teste de adesão de linhagens *Escherichia coli* de origem aviária em epitélio de traquéia de embriões de aves. **A:** linhagem S13 (adesão positiva com adição de D-manose). **B:** linhagem O1 (adesão negativa). **C:** (linhagem S23 adesão positiva sem adição de D-manose). **D:** linhagem S23 (adesão positiva com adição de D-manose). Aumento de 1000X.

2. Teste de microhemaglutinação

Os resultados dos testes de microhemaglutinação frente a diferentes eritrócitos (bovinos, eqüinos, ovinos, humanos, de cobaia e de galinha) com as linhagens cultivadas em diferentes meios de cultura (TSA, LA, Mínimo, CFA, Minca) estão demonstrados na Tabela VI.

Entre as linhagens isoladas de aves saudáveis (indicadas como N1 a N30), a aglutinação de eritrócitos bovinos foi observada somente quando as linhagens foram cultivadas em meios TSA e CFA. Sete das 30 linhagens originárias de aves saudáveis aglutinaram eritrócitos bovinos (23%), sendo que três (10%) exibiram aglutinação quando cultivadas em meio CFA, duas quando cultivadas em meio TSA (6%) e duas quando cultivadas em CFA e TSA (6%). Entre estas mesmas linhagens, e que aglutinaram hemácias bovinas quando cultivadas em meio CFA, duas (N9 e N11) apresentaram aglutinação manose resistente e uma (N15) apresentou hemaglutinação manose sensível. Quando o cultivo foi realizado em meio TSA, a linhagem N14 apresentou aglutinação manose sensível e N21 exibiu hemaglutinação manose resistente. As linhagens N10 e N24 aglutinaram eritrócitos bovinos quando cultivadas em meios TSA e CFA, sendo que a N10 apresentou hemaglutinação manose sensível quando cultivada no meio TSA e manose resistente quando cultivada no meio CFA. A linhagem N24, por outro lado, exibiu hemaglutinação manose sensível de eritrócitos bovinos quando cultivada nos meios TSA e CFA.

A aglutinação de eritrócitos eqüinos foi observada em 13 das linhagens isoladas de aves saudáveis (43%). Neste caso, todos os meios de cultura utilizados (TSA, LA, Mínimo, CFA e Minca) possibilitaram a ocorrência de aglutinação de eritrócitos eqüinos. Quatro linhagens cultivadas em Meio Minca (13%) (N1, N2, N3 e N26) apresentaram hemaglutinação manose sensível, sendo que uma destas (N3) também exibiu hemaglutinação manose sensível quando cultivada em Meio Mínimo. A hemaglutinação manose sensível de eritrócitos eqüinos também

foi observada em linhagens cultivadas no meio CFA (N9, N28), em meio Mínimo (N9 e N20) e em TSA (N14). A linhagem N10 apresentou hemaglutinação manose sensível de eritrócitos eqüinos quando cultivada em Meio Mínimo e meio CFA. Frente aos eritrócitos eqüinos apenas três das linhagens isoladas de aves saudáveis exibiram hemaglutinação manose resistente (10%). Entre estas linhagens, as amostras N21 e N22 apresentaram aglutinação quando cultivadas em meio TSA, sendo que a N21 também exibiu hemaglutinação manose sensível quando cultivada em meio Mínimo. A linhagem N15 exibiu hemaglutinação manose resistente quando cultivada em meio CFA e também hemaglutinação manose sensível quando cultivada em meio TSA, frente a estes eritrócitos.

A aglutinação de eritrócitos ovinos em linhagens isoladas de aves saudáveis foi observada apenas quando estas linhagens foram cultivadas nos meios TSA, CFA e meio Minca. Nove destas linhagens exibiram aglutinação de eritrócitos ovinos (30%) sendo que apenas uma (3% - N21) apresentou hemaglutinação manose resistente. Entre as linhagens que apresentaram hemaglutinação manose sensível, apenas uma a exibiu quando cultivada em meio Minca (N26), três linhagens a apresentaram quando cultivadas em meio TSA (N27, N23 e N15) e quatro hemaglutinaram eritrócitos ovinos quando cultivadas em meio CFA. Assim, a hemaglutinação de eritrócitos ovinos foi observada em maior número quando as linhagens isoladas de aves saudáveis foram cultivadas em meio CFA.

Frente aos eritrócitos humanos, 11 das linhagens isoladas de aves saudáveis apresentaram hemaglutinação positiva (36%), sendo esta mais freqüente quando as linhagens foram cultivadas em meio mínimo [(sete linhagens) (23%)]. Entre estas linhagens, duas apresentaram hemaglutinação manose sensível (N7 e N8) e duas exibiram hemaglutinação manose resistente, N16 e N17. As outras três linhagens também aglutinaram eritrócitos humanos quando cultivadas em outros meios de cultura: as linhagens N14 e N22 apresentaram hemaglutinação manose

resistente em meio Mínimo e hemaglutinação manose sensível quando cultivadas em meio CFA; a linhagem N30 apresentou hemaglutinação manose resistente quando cultivada nos meios Mínimo e LA. Duas linhagens aglutinaram eritrócitos humanos quando cultivadas em meio TSA: N1 exibiu hemaglutinação manose sensível e N11 manose resistente (além de apresentar hemaglutinação manose sensível quando cultivada em meio CFA). Além disso, duas linhagens aglutinaram eritrócitos humanos somente quando cultivadas em CFA, sendo que uma exibiu hemaglutinação manose sensível (N24) e outra aglutinação manose resistente (N13).

Grande parte das linhagens isoladas de aves saudáveis aglutinou eritrócitos de cobaia (21 linhagens, 70%), sendo que dentre estas, 17 (56%) o realizaram quando cultivadas em meio CFA. Doze linhagens exibiram hemaglutinação de eritrócitos de cobaia quando cultivadas em pelo menos dois meios de cultura diferentes. Dentre as linhagens com hemaglutinação positiva de eritrócitos de cobaia, nove (30%) a apresentaram quando cultivadas em apenas um dos meios de cultura testados. Dentre as linhagens com esta característica, sete foram cultivadas em meio CFA, uma em TSA (N10) e outra em Meio Minca (N13). A hemaglutinação manose sensível de eritrócitos de cobaia foi observada em 13 linhagens isoladas de aves saudáveis (43%), sendo que nove destas linhagens também exibiram hemaglutinação manose resistente e quatro apenas hemaglutinação manose sensível. Sete das linhagens isoladas de aves saudáveis (23%) exibiram hemaglutinação manose resistente frente aos eritrócitos de cobaia.

A aglutinação de eritrócitos de galinhas foi observada em 14 das linhagens isoladas de aves saudáveis (46%), sendo que nove (30%) destas linhagens a apresentou quando cultivadas em meio CFA (Tabela VI). Seis linhagens exibiram hemaglutinação manose sensível para eritrócitos de galinha quando cultivadas em meio CFA, sendo que uma destas linhagens (N4) também exibiu aglutinação manose sensível quando cultivada em meio Minca e outra (N14) também apresentou hemaglutinação manose resistente quando cultivada em meio TSA. As linhagens N9,

N13 e N16 apresentaram hemaglutinação manose resistente quando cultivadas em meio CFA, sendo que a linhagem N9 também exibiu hemaglutinação manose sensível quando cultivada em meio Minca e a linhagem N16 também apresentou hemaglutinação manose resistente quando cultivada em meio TSA. As linhagens N15, N24 e N28 aglutinaram eritrócitos de galinha apenas quando foram cultivadas no meio TSA e a linhagem N8 somente o realizou quando foi cultivada em meio Minca. Apenas uma linhagem apresentou aglutinação positiva de eritrócitos de galinha quando cultivada em meio LA (linhagem N2, sendo a aglutinação do tipo manose sensível).

Concluindo, para as linhagens isoladas de aves saudáveis, o cultivo em meio CFA favoreceu a aglutinação manose resistente de eritrócitos bovinos, manose sensível de eritrócitos ovinos, manose resistente de eritrócitos de cobaia e manose sensível de eritrócitos de galinha. Já o cultivo em meio Mínimo favoreceu a aglutinação de eritrócitos humanos.

Frente aos eritrócitos bovinos, 17 (71%) das 24 linhagens isoladas de aves septicêmicas (indicadas como S1-S24) apresentaram aglutinação positiva. Dentre estas, 11 linhagens (46%) exibiram hemaglutinação manose resistente, quatro (16%) apresentaram hemaglutinação manose sensível e duas (8%) apresentaram os dois tipos de hemaglutinação. A hemaglutinação manose resistente de eritrócitos bovinos foi exibida por três linhagens que foram cultivadas em meio Minca (linhagens S1, S2, e S3) e por uma linhagem cultivada em meio CFA (S24). A linhagem S4 exibiu hemaglutinação manose resistente de eritrócitos bovinos quando nos meios CFA e Minca. Além disso, quatro linhagens exibiram hemaglutinação manose resistente quando foram cultivadas nos meios LA e CFA (linhagens S6, S7, S9 e S15) e apenas uma linhagem exibiu esta característica quando cultivada nos meios LA, CFA e Minca (S13). Duas linhagens que exibiram hemaglutinação manose resistente também apresentaram hemaglutinação manose sensível: a linhagem S10 exibiu hemaglutinação manose resistente quando cultivada nos meios LA e CFA e manose sensível quando cultivada em meio Minca; a linhagem S11 exibiu hemaglutinação

manose resistente quando cultivada em meio CFA e manose sensível quando cultivada em meio LA. A hemaglutinação manose sensível de eritrócitos bovinos também foi observada nas linhagens S8, S20 e S21. A linhagem S8 aglutinou esses eritrócitos quando cultivada nos meios LA e Minca; a linhagem S20 apenas quando cultivada em meio Minca e a linhagem S21 apresentou hemaglutinação de hemácias bovinas quando cultivada em meio LA.

A hemaglutinação de eritrócitos eqüinos foi observada em 15 das 24 linhagens isoladas de aves septicêmicas (62,5%) sendo que duas (8%) apresentaram hemaglutinação manose resistente (S1 e S4), 11 (45%) exibiram hemaglutinação manose sensível e duas linhagens (8%) apresentaram os dois tipos de hemaglutinação (S12 e S24). Dez linhagens (13%) apresentaram hemaglutinação manose sensível quando foram cultivadas em meio Minca. Destas linhagens, duas também apresentaram hemaglutinação manose sensível quando cultivadas em CFA (S11 e S12) sendo que a linhagem S12 também exibiu hemaglutinação manose resistente quando cultivada em LA; duas linhagens também apresentaram hemaglutinação manose sensível quando cultivadas em meio TSA (S16 e S24), sendo que a linhagem S24 também apresentou hemaglutinação manose resistente quando cultivada em meio CFA. A linhagem S13 exibiu hemaglutinação manose sensível quando cultivada em meio CFA e a linhagem S7 a apresentou quando cultivada em meio LA.

Dezenove das 24 linhagens originárias de aves septicêmicas (79%) aglutinaram eritrócitos de carneiro, sendo que 12 (50%) exibiram hemaglutinação manose-sensível, 5 (20%) manose resistente e duas linhagens (8%) exibiram os dois tipos de hemaglutinação (S10 e S15). Dentre as linhagens que exibiram hemaglutinação manose sensível, seis foram cultivadas em meio LA (nas quais as linhagens S11 e S18 também apresentaram hemaglutinação manose sensível, quando cultivadas em meio CFA), quatro em meio mínimo (das quais a linhagem S22 exibiu hemaglutinação manose sensível quando cultivada em meio Minca), um em meio CFA (S23) e

uma (S7) em meio Minca. Duas linhagens (S4 e S5) exibiram hemaglutinação manose resistente quando cultivadas em LA, CFA e Minca e uma (S12) quando cultivada em meio TSA.

Onze linhagens isoladas de aves com septicemia (45%) aglutinaram eritrócitos humanos, sendo que cinco (20%) apresentaram hemaglutinação manose resistente, cinco (20%) manose sensível e uma (4%; linhagem S16) exibiu os dois tipos de hemaglutinação. As cinco linhagens que apresentaram hemaglutinação manose resistente a exibiram quando cultivadas em meio CFA, sendo que 1 também mostrou hemaglutinação manose resistente quando cultivada em meio TSA. Entre as cinco linhagens que apresentaram hemaglutinação manose sensível, as linhagens S12 e S14 a exibiram quando cultivadas em meio CFA, S17 em meio Mínimo, S18 em meio LA e a linhagem S23 em meio TSA. Nenhuma linhagem isolada de aves com septicemia aglutinou eritrócitos humanos quando o cultivo foi realizado em meio Minca.

Dezesseis das 24 linhagens isoladas de aves septicêmicas (66%) aglutinaram eritrócitos de cobaia, sendo que sete linhagens (29%) exibiram hemaglutinação manose sensível, duas (8%) manose resistente e sete linhagens (29%) apresentaram os dois tipos de hemaglutinação (Tabela VI). Oito linhagens (33%) aglutinaram eritrócitos de cobaia quando cultivadas em meio Minca. Dentre estas linhagens, quatro (S4, S6, S11, S15) apresentaram hemaglutinação manose resistente em meios Minca e CFA e também aglutinação manose sensível quando cultivadas em outros meios de cultura; uma apresentou apenas hemaglutinação manose resistente (S10); duas linhagens apresentaram aglutinação manose sensível sendo que uma também exibiu hemaglutinação manose resistente quando cultivada em meio CFA (S18) e uma exibiu apenas hemaglutinação manose sensível (S13). Entre as linhagens que não exibiram aglutinação de eritrócitos de cobaia quando cultivadas em meio Minca, três linhagens aglutinaram eritrócitos de cobaia quando cultivadas em meio CFA (S1, S12 e S20), uma quando foi cultivada nos meios

CFA e Mínimo (S22), uma quando foi cultivada em meio Mínimo (S23), uma quando cultivada em meio LA (S8) e uma quando cultivada em meio TSA (S24).

Frente aos eritrócitos de galinha 11 das 24 linhagens isoladas de aves septicêmicas (46%) exibiram aglutinação positiva. A hemaglutinação manose sensível foi observada em três (12,5%) linhagens sendo que duas a exibiram quando cultivadas em meio TSA (S22 e S23) e uma linhagem quando cultivada em meio LA (S11). A hemaglutinação manose resistente foi observada em 8 linhagens (33%) sendo que sete a exibiram quando cultivadas em meio LA e uma quando cultivada em meio CFA (S19). Entre as sete linhagens que exibiram hemaglutinação manose resistente quando cultivadas em meio LA, duas também a apresentaram quando cultivadas em meio CFA (S14 e S17), uma também a exibiu quando cultivada em meio TSA (S24) e duas quando cultivadas em Meio Mínimo (S15 e S18). Nenhuma destas linhagens apresentou os dois tipos e hemaglutinação. Além disso, não foi observada hemaglutinação quando o cultivo foi realizado em meio Minca.

Concluindo, para as linhagens originárias de aves com septicemia o meio de cultura CFA favoreceu a aglutinação manose resistente frente a eritrócitos bovinos e humanos. A aglutinação tipo manose resistente com eritrócitos de eqüinos e manose sensível com eritrócitos de cobaia foi observada em maior frequência quando o cultivo das linhagens foi realizado em meio Minca. Por outro lado, o meio LA favoreceu a aglutinação manose resistente frente a eritrócitos ovinos e de galinha.

Linhagens originárias de aves com Síndrome da Cabeça Inchada (indicadas como SCI1 a SCI4, SCI6 a SCI15) aglutinaram eritrócitos bovinos apenas quando cultivadas nos meios Mínimo e LA. Seis destas linhagens apresentaram hemaglutinação manose sensível (43%), entre as quais quatro (28%) (SCI2, SCI3 SCI4 e SCI5) a exibiram quando cultivadas em meio Mínimo, uma (7%) quando cultivada em meio LA (SCI 10) e uma (7%) apresentou hemaglutinação

manose sensível quando cultivada em meio Mínimo e manose resistente quando cultivada em meio LA (SCI12).

Apenas as linhagens SCI10 e SCI15, dentre as 14 isoladas de aves com Síndrome da Cabeça Inchada, aglutinaram eritrócitos eqüinos. As duas exibiram hemaglutinação manose sensível sendo que SCI10 quando cultivada em meio CFA e SCI15 quando cultivada em meio Minca.

Cinco linhagens originárias de aves com síndrome da cabeça inchada (36%) apresentaram aglutinação positiva em eritrócitos ovinos sendo que apenas uma (SCI10) exibiu hemaglutinação manose resistente (7%). Dentre as quatro linhagens com hemaglutinação manose sensível, duas a exibiram quando cultivadas em meio Minca (SCI9 e SCI12), uma quando cultivada em meio Mínimo (SCI14) e uma quando cultivada nos meios TSA, Mínimo e Minca (SCI15).

Frente aos eritrócitos humanos, apenas as linhagens isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada cultivadas em CFA e Minca apresentaram hemaglutinação positiva (Tabela VI). Quatro linhagens aglutinaram eritrócitos humanos quando cultivadas em CFA (28%) sendo que duas apresentaram hemaglutinação manose sensível (SCI8 e SCI10) e 2 manose resistente (SCI12 e SCI13). A linhagem SCI 15 exibiu hemaglutinação manose sensível quando cultivada em meio Minca e manose resistente quando cultivada em meio CFA.

Sete linhagens originárias de aves com síndrome da cabeça inchada (50%) aglutinaram eritrócitos de cobaia sendo que apenas uma (7%) apresentou aglutinação manose resistente (SCI10). Dentre as linhagens que exibiram aglutinação manose sensível, três a realizaram quando cultivadas em meio Mínimo (SCI3, SCI6 e SCI13), uma quando cultivada em meio TSA (SCI1), uma quando cultivada nos meios TSA e Mínimo (SCI15) e uma quando cultivada nos meios Minca e CFA (SCI8).

Seis das 14 linhagens originárias de aves com síndrome da cabeça inchada (43%) apresentaram aglutinação positiva frente a eritrócitos de galinha. Entre estas linhagens, três (21%) a exibiram quando cultivadas em meio LA, sendo que uma linhagem apresentou hemaglutinação manose sensível (SCI14) e duas exibiram hemaglutinação manose resistente (SCI12 e SCI13). Além disso, três linhagens exibiram hemaglutinação manose sensível: a linhagem SCI8 a exibiu quando cultivada nos meios Mínimo, CFA e Minca; SCI9 apenas quando foi cultivada em meio Mínimo e a linhagem SCI10 quando cultivada em meio Minca e manose resistente ao ser cultivada nos meios TSA, LA e CFA.

Concluindo, para as linhagens isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada, o cultivo em meio Mínimo favoreceu a aglutinação manose sensível com eritrócitos bovinos e de cabaia; a utilização de meio Minca favoreceu a aglutinação manose sensível com eritrócitos ovinos, enquanto o cultivo em meio CFA favoreceu a aglutinação manose resistente de eritrócitos humanos e o cultivo meio LA favoreceu a aglutinação manose resistente de eritrócitos de galinha.

Cinco linhagens isoladas de aves com onfalite (45%) apresentaram aglutinação positiva frente a eritrócitos bovinos. Destas linhagens, três (27%) apresentaram hemaglutinação manose sensível (linhagens O5, O6 e O10), a linhagem O11 (9%) exibiu hemaglutinação manose resistente e as linhagens O4 e O9 exibiram os dois tipos de hemaglutinação. As linhagens com hemaglutinação manose sensível a exibiram apenas quando cultivada em meio Mínimo. Contudo as linhagens que mostraram os dois tipos de hemaglutinação apresentaram hemaglutinação manose sensível quando cultivadas em outros meios: a linhagem O4 apresentou hemaglutinação manose sensível quando cultivada em meio Minca e manose resistente quando cultivada nos meios LA e CFA; a linhagem O9, por outro lado, exibiu hemaglutinação manose sensível quando cultivada em meio TSA e manose resistente em meio CFA.

A aglutinação de eritrócitos eqüinos foi observada em cinco linhagens isoladas de aves com onfalite (45%). Apenas uma linhagem (9%) exibiu hemaglutinação manose resistente (O11). Dentre as quatro linhagens com hemaglutinação manose sensível, duas a exibiram quando cultivadas em meio CFA (O3 e O5) e uma quando cultivada em meio Minca (O6); a linhagem O4 exibiu hemaglutinação manose sensível ao ser cultivada nos meios TSA, CFA e Minca.

A aglutinação de eritrócitos ovinos também foi observada em cinco linhagens isoladas de aves com onfalite (45%). Quatro destas linhagens (36%) exibiram hemaglutinação de eritrócitos ovinos ao serem cultivadas em meio TSA, sendo que três (27%) exibiram aglutinação manose sensível (O5, O7 e O9) e uma linhagem (9%) manose resistente (O11). A linhagem O1 exibiu hemaglutinação manose sensível ao ser cultivada em meio Mínimo.

Apenas a linhagem O11, entre as isoladas de aves com onfalite, aglutinou eritrócitos humanos. A aglutinação manose resistente de O11 foi observada quando a linhagem foi cultivada nos meios TSA e CFA.

Oito das 11 linhagens isoladas de aves com onfalite (72%) aglutinaram eritrócitos de cobaia, dentre estas, cinco (45%) exibiram hemaglutinação manose sensível, duas linhagens (18%) (O5 e O9) manose resistente e uma (9%) apresentou os dois tipos de hemaglutinação (O11). Entre as linhagens com hemaglutinação manose sensível, três a exibiram quando cultivadas em meio CFA (O2, O3 e O7), uma quando cultivada nos meios TSA, CFA e Minca (linhagem O4) e uma ao ser cultivada nos meios TSA e Mínimo (linhagem O10).

Apenas duas linhagens isoladas de aves com onfalite (18%) aglutinaram eritrócitos de galinha; a linhagem O7 apresentou hemaglutinação manose resistente ao ser cultivada em meio Minca e O11 quando cultivada em meio TSA.

Concluindo, para as linhagens isoladas de aves com onfalite (indicadas como O1 a O11), a utilização do meio mínimo favoreceu a aglutinação manose sensível de eritrócitos bovinos, o

cultivo em meio CFA favoreceu a hemaglutinação manose sensível de eqüinos e a utilização de meio TSA favoreceu a aglutinação manose resistente de eritrócitos ovinos.

Analisando-se o número total das linhagens (79), verificou-se que a hemaglutinação de eritrócitos de cobaia foi a mais freqüente, sendo observada em 52 linhagens (65%). A aglutinação de hemácias humanas foi observada em 42 linhagens (53%) e a aglutinação de eritrócitos ovinos foi verificada em 38 linhagens (58%). A aglutinação de eritrócitos eqüinos e de galinha foi observada em 35 linhagens (54%).

A determinação do padrão de hemaglutinação manose resistente, observado após o cultivo em cada meio de cultura, permitiu que as linhagens bacterianas fossem divididas em 40 grupos (Tabela VII). As linhagens N10, O9, O4, S7 e S10 apresentaram padrão de hemaglutinação semelhante ao descrito para a adesina CFAII/CS3 presente em linhagens de EPEC de origem humana (Mooi & De Graaf, 1985). As linhagens SCI13, SCI15, SCI12 e O11 apresentaram padrão de hemaglutinação semelhante ao exibido pela adesina FB171, descrita por Girón *et al.* (1993), presente em linhagens de *Escherichia coli* de origem humana. As demais linhagens exibiram padrões de hemaglutinação ainda não relacionados à expressão de fimbrias já descritas na literatura.

Tabela VI: Microhemaglutinação, adesão em traquéia de aves e observação de fimbrias em microscopia eletrônica de transmissão para linhagens de *Escherichia coli* isoladas de aves saudáveis (N1 a N30), aves com septicemia (S1 a S24), aves com síndrome da cabeça inchada (SCI1 a SCI4, SCI6-SCI15) e de aves com onfalite (O1 a O11) cultivadas em meio TSA (1), meio LA (2), meio mínimo (3), meio CFA (4) e meio Minca (5).

Linhagens	Microhemaglutinação / Eritrócitos						Adesão em traquéia de embriões de aves	MET
	Bovino	Equino	Ovino	Humano	Cobaia	Galinha		
N1	-	MS5	-	MS1	MS1,3	-	MR	+
N2	-	MS5	-	-	MS2,4,5/MR1	MS2	MR	+
N3	-	MS3,5	-	-	-	-	MR	-
N4	-	-	-	-	-	MS4,5	MS	-
N5	-	-	-	-	-	-	MS	-
N6	-	-	-	-	-	-	MS	-
N7	-	-	-	MS3	MR4	-	MR	-
N8	-	-	-	MS3	MS3,4/MR5	MS5	MS	+
N9	MR4	MS4	MS4	-	MR4	MS5/MR4	MS	-
N10	MS1/MR4	MS3,4	-	-	MS1	-	MR	-
N11	MR4	-	-	MS4/MR1	MS3/MR4	-	MS	-
N12	-	-	-	-	-	-	MR	-
N13	-	-	-	MR4	MR5	MR4	MR	+
N14	MS1	MS1	-	MS4/MR3	MS5/MR1	MS4/MR1	MS	-
N15	MS4	MS1/MR4	MS1	-	MR4	MR1	-	+
N16	-	MS2	-	MR3	-	MR1,4	MR	-
N17	-	-	-	MR3	MR4	MS4	MS	-
N18	-	-	-	-	-	-	-	-
N19	-	-	MS4	-	-	-	MR	+
N20	-	MS3	MS4	-	MS4,5	MS4	MS	+
N21	MR1	MS3/MR1	MR1,4	-	MR4	-	-	-
N22	-	MR1	-	MS4/MR3	MS5/MR1,4	MS4	-	+
N23	-	-	MS1	-	MR4	MS4	MR	-
N24	MS1,4	-	MS4	MS4	MS1,5/MR4	MS1	-	-
N25	-	-	-	-	MS3,5/MR1,4	-	-	-
N26	-	MS5	MS5	-	MS3/MR4	-	-	-
N27	-	-	MS1	-	-	-	MS	-
N28	-	MS	-	-	MS3,4	MR1	-	-
N29	-	-	-	-	MR4	-	-	-
N30	-	-	-	MR2,3	MS5/MR4	-	-	-
S1	MR5	MR2	MS2	-	MS4	-	-	+
S2	MR5	-	-	-	-	-	MS	-
S3	MR5	-	MS2	-	-	-	MR	-
S4	MR4,5	MR2	MR2,4,5	MR4	MS3/MR2,4,5	-	MS	-
S5	-	MS5	MR2,4,5	-	-	-	MR	-
S6	MR2,4	-	-	MR4	MS1/MR4,5	-	MS	-
S7	MR2,4	MS2	MS5	-	MS2,4,5	-	-	+
S8	MS2,5	MS5	MS2	-	MS2	-	-	-
S9	MR2,4	-	MS2	-	-	-	MR	-
S10	MS5/MR2,4	MS2,4	MS2/MR4	-	MR2,4,5	-	-	-
S11	MS2/MR4	MS4,5	MS2,4	MR4	MS2/MR4,5	MS2	-	+
S12	MR4	MS4,5/MR2	MR1	MS4	MR4	-	-	+
S13	MR2,4,5	MS4	MR2,4,5	-	MS2,5	-	MR	+
S14	MS4	-	-	MS4	-	MR2,4	-	-
S15	MR2,4	MS1,5	MS1,5/MR2,4	-	MS1/MR4,5	MR2,3	MR	-
S16	-	MS5	-	MS3/MR4	MS1	MR2,4	MR	-
S17	-	-	MS3	MS3	-	MR2	MR	-
S18	-	-	MS2,4	MS2	MS5/MR4	MR2,3	-	-
S19	-	MS5	MS3	-	-	MR4	-	-
S20	-	-	MS3	-	MS4	-	-	-
S21	MS2	-	MR5	-	-	MR2	-	+
S22	-	MS5	MS3,5	MR4	MS3/MR4	MS1	-	-
S23	-	MS5	MS4	MS1	MS3	MS1	MR	+
S24	MR4	MS1,5/MR4	-	MR1	MS/R1	MR1,2	-	-
SCI1	-	-	-	-	MS1	-	MS	+
SCI2	MS3	-	-	-	-	-	MR	-
SCI3	MS3	-	-	-	MS3	-	MR	-
SCI4	MS3	-	-	-	-	-	MR	+
SCI6	MS3	-	-	-	MS3	-	-	-
SCI7	-	-	-	-	-	-	MR	+
SCI8	-	-	-	MS4	MS4,5	MS3,4,5	MS	+
SCI9	-	-	MS5	-	MS3	-	MR	-
SCI10	MS2	MS4	MR2,4	MS4	MR2,4,5	MS5/MR1,2,4	MR	-
SCI11	-	-	-	-	-	-	-	-
SCI12	MS3/MR2	-	MS5	MR4	-	MR2	-	-
SCI13	-	-	-	MR4	-	MR2	MS	-
SCI14	-	-	MS3	-	MS3	MS2	MS	+
SCI15	-	MS5	MS1,3,5	MS5/MR4	MS1,3	-	-	-
O1	-	-	MS3	-	-	-	-	-
O2	-	-	-	-	MS4	-	-	-
O3	-	MS4	-	-	MS4	-	-	+
O4	MS5/MR2,4	MS1,4,5	-	-	MS1,4,5	-	-	-
O5	MS3	MS4	MS1	-	MR1,4	-	MS	-
O6	MS3	MS5	-	-	-	-	-	-
O7	-	-	MS1	-	MS4	MR5	-	-
O8	-	-	-	-	-	-	MS	-
O9	MS1/MR4	-	MS1	-	MR1	-	-	-
O10	MS3	-	-	-	MS1,3	-	MS	-
O11	MR1	MR1	MR1	MR1,4	MS3/MR1	MR1	MR	-

MR: resistência a adição de D-manose; MS: sensibilidade a adição de D-manose; MET: observação de fimbrias em Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Tabela VII. Padrões de microhemaglutinação observados nas linhagens de *Escherichia coli* isoladas de aves cultivadas nos meios TSA, LA, mínimo, CFA e minca frente a eritrócitos bovinos, eqüinos, ovinos, humanos, de cobaia e de galinha.

Hemaglutinação	Meio de cultura	Linhagens	Observações
Boi, cobaia e galinha	CFA	N9	Não descrito
Boi	CFA	N10,O9,O4,S7,S10	Semelhante ao descrito para CFAll/CS3 (Mooi & De Graaf, 1985)
Boi	Minca	S2,S3,S9,S1	Não descrito
Boi	LA	S9,S7,S6,S11	Não descrito
Boi, humano e cobaia	CFA	S6,S11	Não descrito
Cobaia	Minca	S6,S11,N13,SCI10,S10	Não descrito
Boi e cobaia	CFA	N11,S12	Não descrito
Humano	TSA	N11	Não descrito
Humano e galinha	CFA	N13,S16	Não descrito
Humano	Mínimo	N14,N16,N17, N22,N30	Não descrito
Cobaia e galinha	TSA	N14	Não descrito
Cavalo e cobaia	CFA	N15	Não descrito
Galinha	TSA	N15,N28,SCI10	Não descrito
Galinha	CFA	N16,S19,S14	Não descrito
Humano e galinha	CFA	S16	Não descrito
Humano	CFA	SCI13,SCI15,SCI12,O11	Semelhante ao descrito para FB171 (Girón, <i>et al.</i> , 1993)
Galinha	LA	SCI13,S17,S18,S24,S14,S21	Não descrito
Cobaia	CFA	N17,N30,N6,N23,N24,N25,N26,N29,O5	Não descrito
Humano e Cobaia	CFA	S22,N22	Não descrito
Boi, cavalo e carneiro	TSA	N21	Não descrito
Carneiro e cobaia	CFA	N21,SCI10	Não descrito
Cavalo	LA	S12,S1,S4	Não descrito
Carneiro	TSA	S12	Não descrito
Cavalo e cobaia	TSA	N22	Não descrito
Boi,carneiro, humano e cobaia	CFA	S4	Não descrito
Boi, carneiro e cobaia	Minca	S4	Não descrito
Carneiro	LA	S5,SCI10	Não descrito
Carneiro	CFA	S5	Não descrito
Carneiro	Minca	S5,S21	Não descrito
Boi. Cobaia	LA	S10	Não descrito
Galinha	Minca	O7	Não descrito
Galinha	Mínimo	S18	Não descrito
Boi, cavalo	CFA	S24	Não descrito
Humano, cobaia e galinha	TSA	S24	Não descrito
Boi e galinha	LA	SCI12	Não descrito
Boi	TSA	O9	Não descrito
Boi, carneiro, humano, cobaia, galinha e cavalo	TSA	O11	Não descrito
Cobaia	LA	N2	Não descrito
Cobaia	TSA	O5	Não descrito
Boi e carneiro	CFA,Minca e LA	S13	Não descrito

3. Visualização de fímbrias em microscopia eletrônica de transmissão

Para a visualização de fímbrias em microscopia eletrônica de transmissão, a linhagem S13 foi utilizada como padrão positivo de expressão de fímbrias por apresentar adesão e invasão em cultura de células HeLa e Hep2. A linhagem S13 foi cultivada em cinco meios de cultura (LB, TSB, Minca, CFA e Mínimo) para verificar qual deles melhor poderia favorecer a expressão de fímbrias nesta linhagem. Foram observadas estruturas fímbrias na superfície de S13 em todos os meios de cultura utilizados (Figura 2). Como a linhagem S13 expressou estruturas fimbriais visualmente diferentes após o cultivo em todos os meios de cultura utilizados, e como o teste de adesão em anéis de traquéia foi realizado com as linhagens cultivadas em meio LB, a observação das demais linhagens bacterianas foi realizada após crescimento em meio LB a 37°C durante 18 horas.

As estruturas fimbriais observadas na superfícies das linhagens foram encontradas em quatro tipos morfológicos: fímbrias bem delimitadas envolvendo toda a superfície bacteriana semelhantes ao observado em S13 (Figura 2D); sob a forma de fibrilas, como o observado na linhagem S19 (Figura 3B); fímbrias de formato irregular semelhante ao observado em S11 (Figura 3-A) e fímbrias longas semelhante ao observado em SCI14 (Figura 3C).

Entre as linhagens isoladas de aves saudáveis (indicadas N1 a N30), foram observadas estruturas fimbriais em nove linhagens (30%). Entre estas linhagens, quatro apresentaram adesão manose resistente em epitélio traqueal (N1, N2, N12 e N19), três apresentaram adesão manose sensível (N8 e N20) e duas exibiram adesão negativa (N15 e N18) (Tabela VI).

Dez (41,6%) linhagens originárias de aves com septicemia (indicadas como S1 a S24) exibiram fímbrias em sua superfície, sendo que quatro apresentaram adesão manose resistente em

epitélio traqueal de aves (S5, S9, S13 e S23), uma linhagem exibiu adesão manose sensível (S4) e cinco não aderiram em epitélio traqueal (S1, S7, S11, S12 e S21) (Tabela VI).

Sete linhagens isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada (50%) apresentaram fimbrias em sua superfície (Tabela VI). Destas linhagens, três apresentaram adesão manose resistente em epitélio traqueal de aves (SCI4, SCI7 e SCI9), três linhagens exibiram adesão manose sensível (SCI1, SCI8 e SCI14) e uma linhagem apresentou adesão negativa em epitélio traqueal de aves (SCI15).

Apenas três linhagens isoladas de aves com onfalite exibiram estruturas fimbrias em sua superfície (Tabela VI). As linhagens O2 e O3 não apresentam capacidade de adesão em epitélio de traquéia de aves e a linhagem O7, por outro lado, exibiu adesão manose sensível em epitélio traqueal de aves.

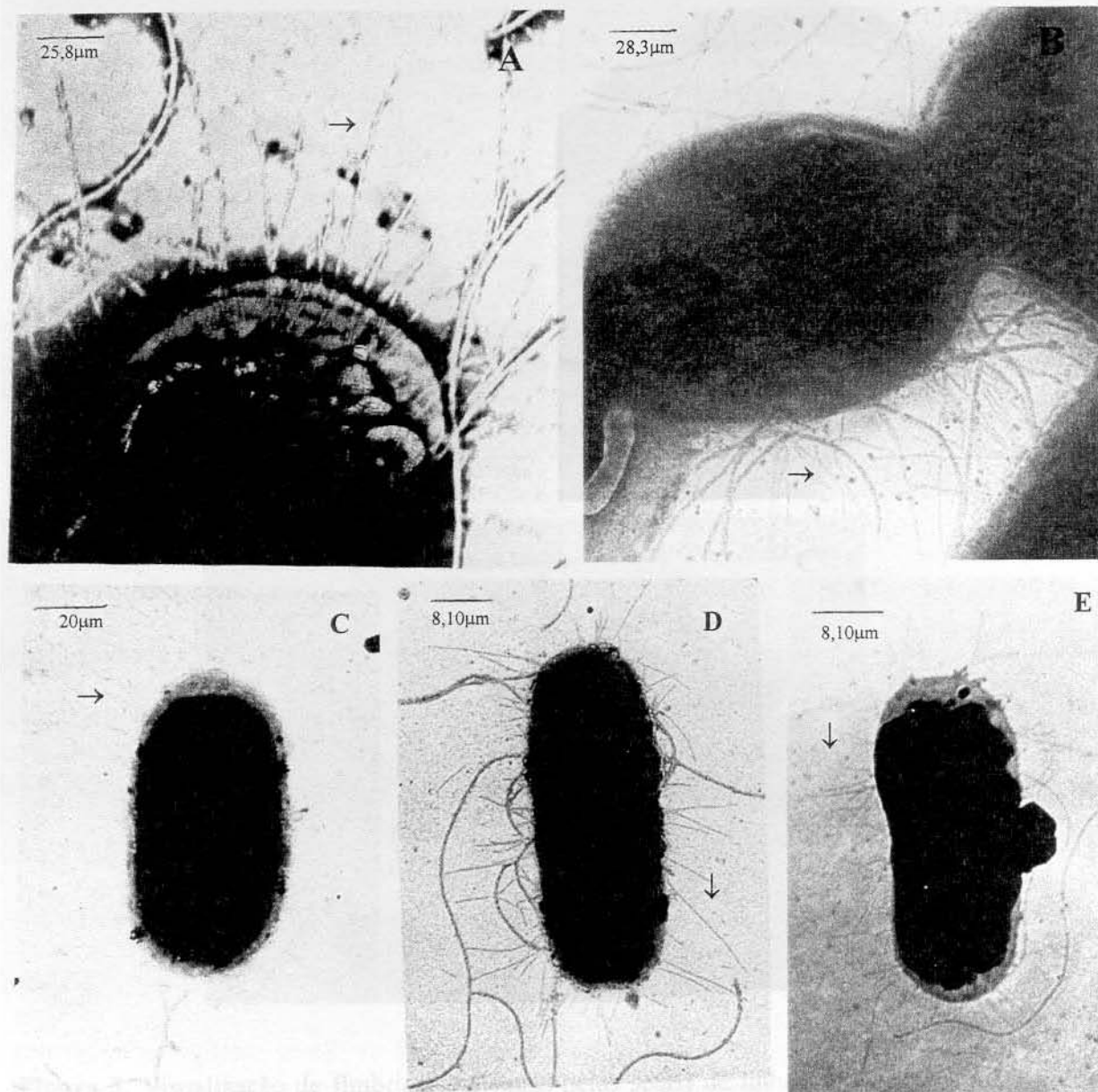


Figura 2: Visualização de fímbrias (indicada pelas setas) da linhagem S13 de *Escherichia coli* isolada de ave com septicemia em Microscopia eletrônica de transmissão. **A:** Cultivo em meio TSB (56000X). **B:** Cultivo em meio Minca (61500X). **C:** Cultivo em Meio Mínimo (80000X). **D:** Cultivo em meio CFA (32500X). **E:** Cultivo em meio LB (32500X).

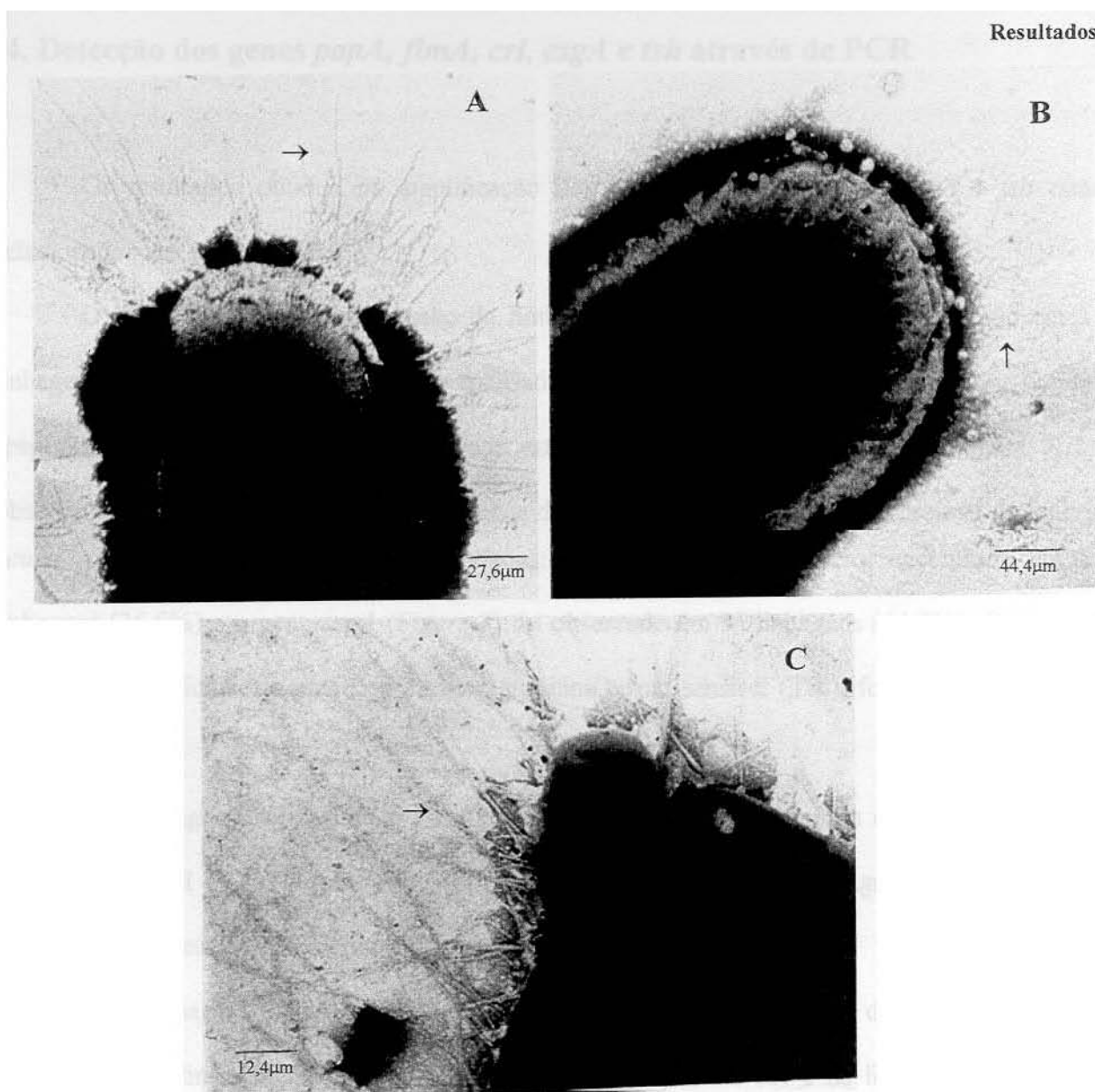


Figura 3. Visualização de fímbrias (indicadas pelas setas) de linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária em microscopia eletrônica de transmissão. **A:** Linhagem S11 (60000X). **B:** Linhagem S19 (127000X). **C:** Linhagem SCI14 (27000X).

4. Detecção dos genes *papA*, *fimA*, *crl*, *csgA* e *tsh* através de PCR

Os resultados obtidos na amplificação dos genes *papA*, *fimA*, *crl*, *csgA* e *tsh* estão relacionados nas tabelas VIII e IX.

O gene relacionado à expressão da fimbria P (*papA* - Figura 4) foi encontrado em 11 linhagens (14%) sendo, dentre os genes analisados, o que em menor frequência apareceu. O gene responsável pela codificação da subunidade estrutural da fimbria tipo 1 (*fimA* - Figura 5) foi observado em 24 linhagens (30%). A presença de dois genes relacionados à expressão da fimbria “*curli*” foi analisada nas linhagens estudadas: o gene *crl* (Figura 6) foi encontrado em 21 linhagens (26,5%) e o gene *csgA* (Figura 7) foi observado em 35 linhagens (44,3%). O gene *tsh* (Figura 8), relacionado à presença da hemaglutinina termo-sensível (Tsh), foi encontrado em 16 linhagens (20%).

Nas linhagens isoladas de aves saudáveis foram encontrados apenas os genes *fimA*, *crl* e *tsh* (Tabelas VIII e IX). O gene *fimA* foi observado em cinco destas linhagens (16,6%), *crl* em três (10%) e o gene *tsh* foi encontrado em três linhagens.

Duas linhagens isoladas de aves saudáveis (6%) apresentaram dois dos genes analisados (tabela IX); na linhagem N2 foram detectados os genes *fimA* e *tsh* e na linhagem N10 foram encontrados os genes *fimA* e *crl*. Além destas linhagens, o gene *fimA* foi detectado nas linhagens N7, N11 e N22. O gene *crl* foi observado nas linhagens N14 e N27 e o gene *tsh* foi observado nas linhagens N15 e N19. Os genes *papA* e *csgA* não foram detectados nas linhagens isoladas de aves saudáveis.

Os cinco genes relacionados à presença de fatores de colonização estudados e descritos em APEC foram encontrados nas linhagens isoladas de aves com septicemia. O gene *papA*, e

gene *tsh*, foram encontrados isoladamente em seis (25%) destas linhagens (tabela IX). Os genes *fimA* e *crl*, por outro lado, foram observados em sete das linhagens isoladas de aves septicêmicas (29,1%). O gene *csgA* foi o mais encontrado entre as linhagens originárias de aves septicêmicas, sendo detectado em 20 destas linhagens (83,3%) e o gene *tsh* foi detectado em seis destas mesmas linhagens (25%) (tabela IX).

Seis das linhagens originárias de aves com septicemia (25%) apresentaram apenas um dos genes analisados (tabela VIII); apenas o gene *papA* foi encontrado na linhagem S8; nas linhagens S4, S9, S14, S16 e S19 somente o gene *csgA* foi detectado. Em 11 das linhagens isoladas de aves com septicemia (46%) foram encontrados dois dos cinco genes analisados: nas linhagens S1, S2 e S23 (3/24 ou 12,5%) foram detectados os genes *crl* e *csgA*; nas linhagens S5, S6 e S11 (3/24 ou 12,5%) foram encontrados os genes *papA* e *csgA*; na linhagem S15 (1/24 ou 4%) foram detectados os genes *fimA* e *csgA*; na linhagem S7 (1/24 ou 4%) foram encontrados os genes *fimA* e *crl* e nas linhagens S20, S22 e S24 (3/24 ou 12,5%) foram observados os genes *csgA* e *tsh*.

Cinco das 24 linhagens isoladas de aves com septicemia apresentaram três dos genes analisados; na linhagem S3 foram detectados os genes *crl*, *csgA* e *tsh*; nas linhagens S10 e S12 (2/24 ou 8%) foram encontrados os genes *papA*, *fimA* e *csgA*; na linhagem S13 (1/24 ou 4%) foram observados os genes *fimA*, *crl* e *tsh*; na linhagem S17 (1/24 ou 4%) foram encontrados os genes *fimA*, *crl* e *csgA* e, finalmente, na linhagem S21 (1/24 ou 4%) foram detectados os genes *fimA*, *csgA* e *tsh*.

Nenhum dos cinco genes analisados neste estudo foi encontrado na linhagem S19.

Os cinco genes relacionados à presença de fatores de colonização estudados, descritos em APEC, foram encontrados nas linhagens isoladas de aves com Síndrome da Cabeça Inchada (tabelas VIII e IX). O gene *papA* foi observado em 5 (35,7%) destas linhagens, os genes *fimA* e

csgA foram encontrados em nove linhagens (64,2%) e os genes *crl* e *tsh* foram detectados em 7 destas linhagens (50%).

Doze das 14 linhagens originárias de aves com síndrome da cabeça inchada (86%) apresentaram mais de um dos genes analisados. Por outro lado, somente o gene *csgA* foi detectado na linhagem SCI7 e nenhum dos genes analisados foi encontrado na linhagens SCI13 (tabela VIII).

Três linhagens isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada (21%) apresentaram dois dos genes analisados (tabela IX); na linhagem SCI4 (1/14 ou 7%) foram encontrados os genes *fimA* e *csgA*, na linhagem SCI8 (1/14 ou 7%) foram detectados os genes *fimA* e *crl* e na linhagem SCI14 (1/14 ou 7%) foram observados os genes *papA* e *tsh* (tabela VIII).

Três, entre os cinco genes analisados, foram encontrados em seis linhagens isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada (tabela IX); na linhagem SCI2 (1/14 ou 7%) foram encontrados os genes *fimA*, *csgA* e *tsh*; na linhagem SCI3 (1/14 ou 7%) foram detectados os genes *fimA*, *crl* e *tsh*; na linhagem SCI6 (1/14 ou 7%) foram observados os genes *papA*, *crl* e *csgA*; na linhagem SCI9 (1/14 ou 7%) foram encontrados os genes *papA*, *fimA* e *crl*; na linhagem SCI10 (1/14 ou 7%) foram observados os genes *fimA*, *crl* e *csgA* e na linhagem SCI15 (1/14 ou 7%) foram encontrados os genes *papA*, *csgA* e *tsh* (tabela VIII).

Nas linhagens SCI1, SCI11 e SCI12 foram encontrados quatro genes (tabela IX): os genes *fimA*, *crl*, *csgA* e *tsh* foram detectados nas linhagens SCI1 e SCI12 (14%) e os genes *papA*, *fimA*, *csgA* e *tsh* foram encontrados na linhagem SCI11 (7%) (tabela VIII).

Somente os genes *fimA*, *crl* e *csgA* foram observados em linhagens isoladas de aves com onfalite (tabelas VIII e IX). O gene *fimA* foi observado em 3 (27%) destas linhagens, o gene *crl* em 4 linhagens (36%) e o gene *csgA* foi encontrado em seis linhagens.

Nenhum dos genes analisados foi detectados em cinco (45,5%) das linhagens originárias de aves com onfalite (tabela VIII). Por outro lado, as outras 6 linhagens (54,5%) (linhagens O1, O2, O3, O4, O6, O7) apresentaram pelo menos dois dos genes (tabela VIII): nas linhagens O1 e O7 (18%) foram encontrados os genes *fimA* e *csgA*, nas linhagens O3, O4 e O6 (27%) foram observados os genes *crl* e *csgA* e na linhagem O2 (9%) foram detectados os genes *fimA*, *crl* e *csgA* (tabela VIII).

Tabela VIII: Detecção de genes para fimbria tipo 1, fimbria “*curli*”, fimbria P e hemaglutinina termo-sensível através da PCR em linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária.

Linhagem	Fragmentos amplificados					Linhagem	Fragmentos amplificados				
	<i>papA</i>	<i>fimA</i>	<i>crl</i>	<i>csgA</i>	<i>tsh</i>		<i>papA</i>	<i>fimA</i>	<i>crl</i>	<i>csgA</i>	<i>tsh</i>
N1	-	-	-	-	-	S12	+	+	-	+	-
N2	-	+	-	-	+	S13	-	+	+	-	+
N3	-	-	-	-	-	S14	-	-	-	+	-
N4	-	-	-	-	-	S15	-	+	-	+	-
N5	-	-	-	-	-	S16	-	-	-	+	-
N6	-	-	-	-	-	S17	-	+	+	+	-
N7	-	+	-	-	-	S18	-	-	-	+	-
N8	-	-	-	-	-	S19	-	-	-	-	-
N9	-	-	-	-	-	S20	-	-	-	+	+
N10	-	+	+	-	-	S21	-	+	-	+	+
N11	-	+	-	-	-	S22	-	-	-	+	+
N12	-	-	-	-	-	S23	-	-	+	+	-
N13	-	-	-	-	-	S24	-	-	-	+	+
N14	-	-	+	-	-	SCI1	-	+	+	+	+
N15	-	-	-	-	+	SCI2	-	+	-	+	+
N16	-	-	-	-	-	SCI3	-	+	+	-	+
N17	-	-	-	-	-	SCI4	-	+	-	+	-
N18	-	-	-	-	-	SCI6	+	-	+	+	-
N19	-	-	-	-	+	SCI7	-	-	-	+	-
N20	-	-	-	-	-	SCI8	-	+	+	-	-
N21	-	-	-	-	-	SCI9	+	+	+	-	-
N22	-	+	-	-	-	SCI10	-	+	+	+	-
N23	-	-	-	-	-	SCI11	+	+	-	+	+
N24	-	-	-	-	-	SCI12	-	+	+	+	+
N25	-	-	-	-	-	SCI13	-	-	-	-	-
N26	-	-	-	-	-	SCI14	+	-	-	-	+
N27	-	-	+	-	-	SCI15	+	-	-	+	+
N28	-	-	-	-	-	O1	-	+	-	+	-
N29	-	-	-	-	-	O2	-	+	+	+	-
N30	-	-	-	-	-	O3	-	-	+	+	-
S1	-	-	+	+	-	O4	-	-	+	+	-
S2	-	-	+	+	-	O5	-	-	-	-	-
S3	-	-	+	+	+	O6	-	-	+	+	-
S4	-	-	-	+	-	O7	-	+	-	+	-
S5	+	-	-	+	-	O8	-	-	-	-	-
S6	+	-	-	+	-	O9	-	-	-	-	-
S7	-	+	+	-	-	O10	-	-	-	-	-
S8	+	-	-	-	-	O11	-	-	-	-	-
S9	-	-	-	+	-						
S10	+	+	-	+	-						
S11	+	-	-	+	-						

papA: gene que codifica a subunidade estrutural da fimbria P (*pap A*); *fimA*: gene que codifica a subunidade estrutural da fimbria tipo 1 (*FimA*); *crl*: gene regulador da expressão da fimbria “*curli*”; *csgA*: gene que codifica a subunidade estrutura de “*curli*”; *tsh*: gene codificador de TSH (hemaglutinina termo-sensível).

Tabela IX: Frequência dos genes *papA*, *fimA*, *crl*, *csgA* e *tsh* entre as linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária.

Origem das linhagens	Frequência de linhagens que apresentaram os genes <i>papA</i> , <i>fimA</i> , <i>crl</i> , <i>csgA</i> e <i>tsh</i>	Frequência de linhagens que não apresentaram os genes <i>papA</i> , <i>fimA</i> , <i>crl</i> , <i>csgA</i> e <i>tsh</i>
Aves saudáveis (n=30)	30% <i>fimA</i> =16,6% <i>crl</i> = 10% <i>tsh</i> =10% <i>fimA</i> + <i>tsh</i> =3,3% <i>fimA</i> + <i>crl</i> =3,3%	70%
Aves com Septicemia (n=24)	95,8% <i>papA</i> = 25% <i>fimA</i> = 29,1% <i>crl</i> =29,1% <i>csgA</i> =83,3% <i>tsh</i> =25% <i>fimA</i> + <i>crl</i> =4,1% <i>fimA</i> + <i>csgA</i> =4,1% <i>crl</i> + <i>csgA</i> =12,5% <i>csgA</i> + <i>tsh</i> =12,5% <i>papA</i> + <i>csgA</i> =12,5% <i>crl</i> + <i>csgA</i> + <i>tsh</i> =4,2% <i>fimA</i> + <i>crl</i> + <i>csgA</i> =4,2% <i>papA</i> + <i>fimA</i> + <i>csgA</i> =8,3% <i>fimA</i> + <i>csgA</i> + <i>tsh</i> =4,1% <i>fimA</i> + <i>crl</i> + <i>tsh</i> =4,1%	4,16%
Aves com Síndrome da Cabeça Inchada (n=14)	92,8% <i>papA</i> = 35,7% <i>fimA</i> =64,2% <i>crl</i> =50% <i>csgA</i> = 64,2% <i>tsh</i> =50% <i>fimA</i> + <i>crl</i> =7,1% <i>fimA</i> + <i>csgA</i> =7,1% <i>fimA</i> + <i>crl</i> + <i>csgA</i> =7,1% <i>papA</i> + <i>fimA</i> + <i>crl</i> =7,1% <i>fimA</i> + <i>csgA</i> + <i>tsh</i> =7,1% <i>fimA</i> + <i>crl</i> + <i>tsh</i> =7,1% <i>papA</i> + <i>csgA</i> + <i>tsh</i> =7,1% <i>papA</i> + <i>crl</i> + <i>csgA</i> =7,1% <i>fimA</i> + <i>crl</i> + <i>csgA</i> + <i>tsh</i> =14,3% <i>papA</i> + <i>fimA</i> + <i>csgA</i> + <i>tsh</i> =7,1%	7,14%
Aves com Onfalite (n=11)	54,5% <i>fimA</i> =27,2% <i>crl</i> =36,3% <i>csgA</i> =54,5% <i>fimA</i> + <i>csgA</i> =18% <i>crl</i> + <i>csgA</i> =27% <i>fimA</i> + <i>crl</i> + <i>csgA</i> =3%	45,4%

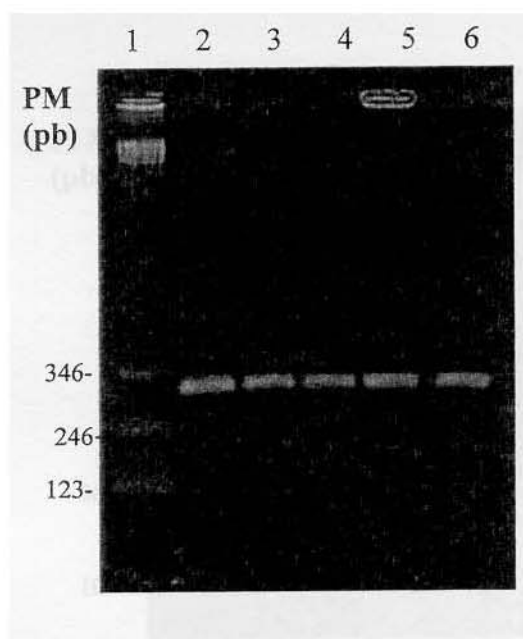


Figura 4. Gel de agarose (1,5%) com o produto de amplificação do gene *papA* (fímbria P) de linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária. **1:** marcador de peso molecular (123pb). **2:** linhagem S5. **3:** linhagem S6. **4:** linhagem SCI6. **5:** linhagem SCI9. **6:** linhagem SCI15.

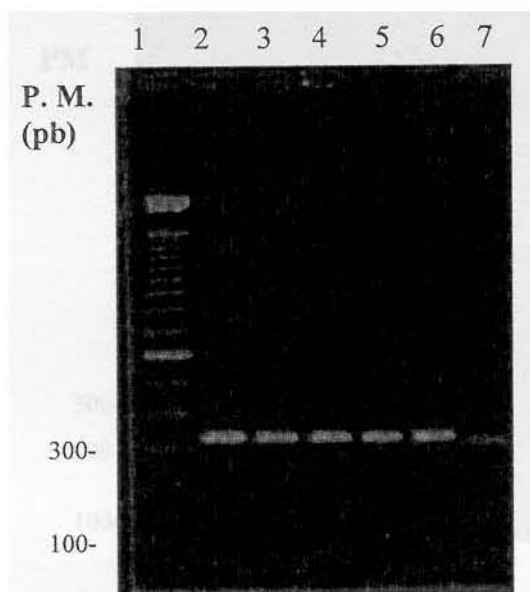


Figura 5. Gel de agarose (1,5%) com o produto de amplificação do gene *fimA* (fímbria tipo 1) de linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária. **1:** marcador de peso molecular (100pb). **2:** linhagem N10. **3:** linhagem S7. **4:** linhagem S13. **5:** linhagem SCI2. **6:** linhagem SCI3. **7:** linhagem O1.

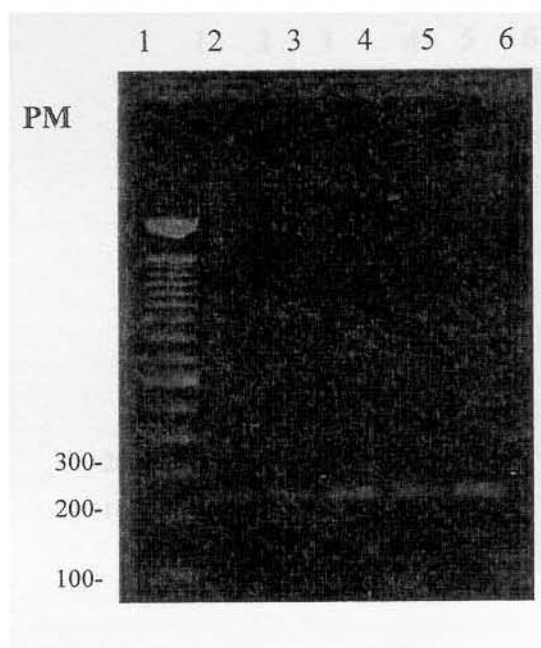


Figura 6. Gel de agarose (1,5%) com o produto de amplificação do gene *crl* (fímbria “curli”) de linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária. **1:** marcador de peso molecular (100pb). **2:** linhagem N10. **3:** linhagem S1. **4:** linhagem S13. **5:** linhagem SCI1. **6:** linhagem O2.

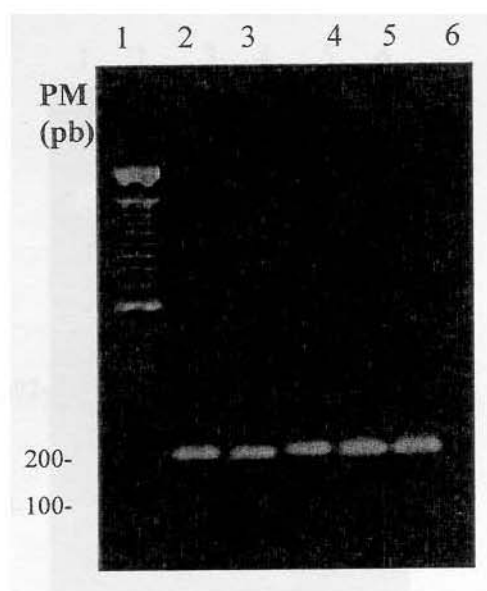


Figura 7. Gel de agarose (1,5%) com o produto de amplificação do gene *csgA* (fímbria “curli”) de linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária. **1:** marcador de peso molecular (100pb). **2:** linhagem S1. **3:** linhagem S2. **4:** linhagem SCI1. **5:** linhagem SCI10. **6:** linhagem O1.

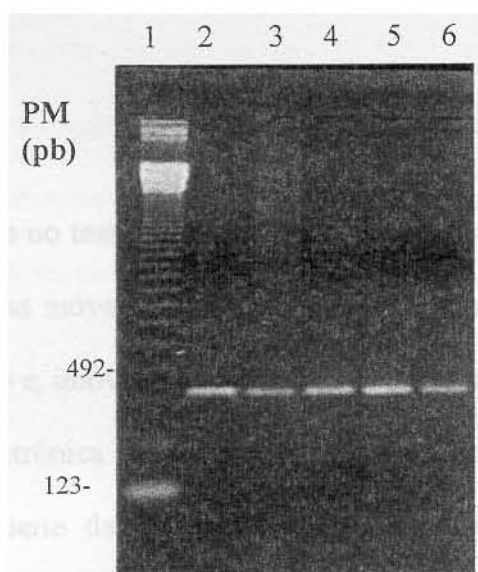


Figura 8. Gel de agarose (1,5%) com o produto de amplificação do gene *tsh* (hemaglutinina TSH) de linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária. **1:** marcador de peso molecular (123pb). **2:** linhagem N15. **3:** linhagem S3. **4:** linhagem S13. **5:** linhagem SC11. **6:** linhagem SC13.

5. Teste de motilidade e visualização de flagelos em microscopia eletrônica de transmissão

Os resultados obtidos no teste de motilidade e expressão de flagelos estão relacionados na tabela X. Foram consideradas móveis as linhagens que turvaram o meio de cultura até 72 horas após a realização do inóculo e, imóveis, as linhagens que não turvaram o meio após este período. Através da microscopia eletrônica de transmissão pode-se constatar que a estrutura flagelar estava presente na maior parte das linhagens que exibiu motilidade positiva. Sete linhagens imóveis, contudo, apresentaram flagelos em sua superfície celular (linhagens S12, S21, S22, SCI7, SCI10, O2 e O5) (tabela X), quando observadas em microscopia eletrônica.

Quarenta e duas linhagens (53%) apresentaram motilidade positiva (tabela X) sendo que destas, 12 foram linhagens originárias de aves com septicemia (50%), 19 linhagens isoladas de aves saudáveis (63%), seis linhagens isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada (43%) e cinco são linhagens originárias de aves com onfalite (45%).

Na observação das linhagens em microscopia eletrônica de transmissão, a estrutura flagelar foi observada em 39 linhagens (tabela X) sendo que 11 foram linhagens isoladas de aves com septicemia (46%), 15 linhagens isoladas de aves saudáveis de (50%), sete são linhagens isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada (50%) e seis são linhagens isoladas de aves com onfalite (54%).

Dentre as linhagens móveis, 15 linhagens (nove isoladas de aves saudáveis e seis de aves doentes) não apresentaram adesão em epitélio traqueal de aves (Tabelas VI e X) e 24 linhagens

(14 isoladas de aves saudáveis e 10 de aves doentes) exibiram adesão em epitélio de traquéia de aves.

Entre as linhagens consideradas não móveis, 18 (nove isoladas de aves doentes e nove de aves saudáveis) apresentaram adesão em epitélio de traquéia de aves. Por outro lado, 16 linhagens com motilidade negativa (14 isoladas de aves doentes e duas de aves saudáveis) não aderiram em epitélio traqueal de aves (tabelas VI e X).

Tabela X. Motilidade e visualização de flagelos em microscopia eletrônica de transmissão (MET) em linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária após 18, 24, 48 e 72 horas de cultivo.

Linhagem	Tempo após a realização do inóculo				Observ. MET	Linhagem	Tempo após a realização do inóculo				Observ. MET
	18hs	24hs	48hs	72hs			18hs	24hs	48hs	72hs	
S1	+	+	+	+	-	N17	-	-	+	+	+
S2	-	-	-	-	-	N18	-	-	-	-	-
S3	-	-	-	-	-	N19	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	N20	-	-	+	+	+
S5	-	-	+	+	-	N21	+	+	+	+	+
S6	+	+	+	+	+	N22	+	+	+	+	-
S7	-	-	-	+	-	N23	-	+	+	+	+
S8	+	+	+	+	+	N24	-	+	+	+	+
S9	+	+	+	+	+	N25	-	+	+	+	+
S10	-	-	-	-	-	N26	-	-	-	-	-
S11	-	-	-	-	-	N27	-	-	-	+	+
S12	-	-	-	-	+	N28	-	-	+	+	-
S13	+	+	+	+	+	N29	-	-	+	+	+
S14	-	-	-	-	-	N30	-	-	+	+	-
S15	-	-	-	-	-	SCI1	-	+	+	+	+
S16	+	+	+	+	-	SCI2	-	-	+	+	-
S17	+	+	+	+	+	SCI3	+	+	+	+	+
S18	+	+	+	+	+	SCI4	+	+	+	+	+
S19	-	-	-	-	-	SCI6	-	-	-	-	-
S20	-	+	+	+	+	SCI7	-	-	-	-	+
S21	-	-	-	-	+	SCI8	-	-	+	+	+
S22	-	-	-	-	+	SCI9	-	-	-	-	-
S23	-	-	+	+	+	SCI10	-	-	-	-	+
S24	-	-	-	-	-	SCI11	-	-	-	-	-
N1	+	+	+	+	+	SCI12	-	-	-	-	-
N2	-	-	-	+	-	SCI13	-	-	-	-	-
N3	-	+	+	+	-	SCI14	-	-	-	-	-
N4	-	-	-	-	-	SCI15	-	-	+	+	+
N5	-	-	-	-	-	O1	-	-	-	-	-
N6	-	-	-	-	-	O2	-	-	-	-	+
N7	-	-	-	-	-	O3	-	-	-	-	-
N8	-	-	+	+	+	O4	-	-	-	-	-
N9	-	-	-	-	-	O5	-	-	-	-	+
N10	-	-	+	+	+	O6	+	+	+	+	+
N11	-	+	+	+	+	O7	+	+	+	+	+
N12	-	-	-	-	+	O8	-	-	-	-	-
N13	-	-	-	-	-	O9	-	-	+	+	+
N14	-	+	+	+	+	O10	+	+	+	+	+
N15	-	+	+	+	+	O11	+	+	+	+	-
N16	-	-	-	-	-						

6. Amplificação do gene *fliC*

A amplificação do gene *fliC* foi obtida em 46 linhagens (58%) (tabela XI). Destas linhagens, oito foram consideradas imóveis no teste de motilidade e não apresentaram flagelos em sua superfície celular (linhagens N4, SCI6, SCI9, SCI11, SCI13, SCI4, O3, O4), quatro foram consideradas imóveis e apresentaram flagelos (SCI10, SCI12, O2 e O5) e 34 foram consideradas móveis e exibiram flagelos em sua superfície celular (tabela XI).

Os fragmentos obtidos na amplificação do gene *fliC* apresentaram tamanhos que variaram de 665 a 1840 pares de base (figura 9). A maioria das linhagens produziu um único fragmento a partir da amplificação de *fliC*. Contudo, sete linhagens produziram dois fragmentos como produto da reação de amplificação. É importante salientar que os cuidados utilizados para a prevenção de amplificação de bandas extras, pela utilização de temperaturas de anelamento mais estridentes, não tiveram sucesso em reduzir este número de bandas observados nestas linhagens.

Tabela XL Tamanho dos fragmentos amplificados do gene *fliC*, motilidade e expressão de flagelos em linhagens *fliC* + de *Escherichia coli* de origem aviária.

Linhagens <i>fliC</i> +	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Motilidade	Expressão de flagelo (MET)
N1	1090	+	+
N3	1780	+	-
N4	1780	-	-
N8	1780	+	+
N9	1780	-	-
N10	1670	+	+
N11	1090	+	+
N14	1670	+	+
N15	1670	+	+
N17	1670	+	+
N20	1670	+	+
N21	1560	+	+
N22	1560	+	+
N23	1670	+	+
N24	1515	+	+
N25	1670	+	+
N29	1560	+	+
S1	1330	+	+
S5	1840	+	+
S6	1840	+	+
S8	1370	+	+
S9	1560,1330	+	+
S13	1330	+	+
S16	1370	+	+
S17	1370	+	+
S18	1370	+	+
S23	1370	+	+
SCI1	1670;665	+	+
SCI3	1670;665	+	+
SCI4	1670;665	+	+
SCI6	1670	-	-
SCI8	1670;665	+	+
SCI9	1670;665	-	-
SCI10	1330	-	+
SCI11	1370	-	-
SCI12	1670	-	+
SCI13	1670	-	-
SCI14	1370	-	-
SCI15	1670	+	+
O1	1090	-	-
O2	1670	-	+
O3	1670	-	-
O4	1330	-	-
O5	1670	-	+
O6	1670	+	+
O7	1670	+	+
O9	1670	+	+

pb= pares de base

MET= microscopia eletrônica de transmissão

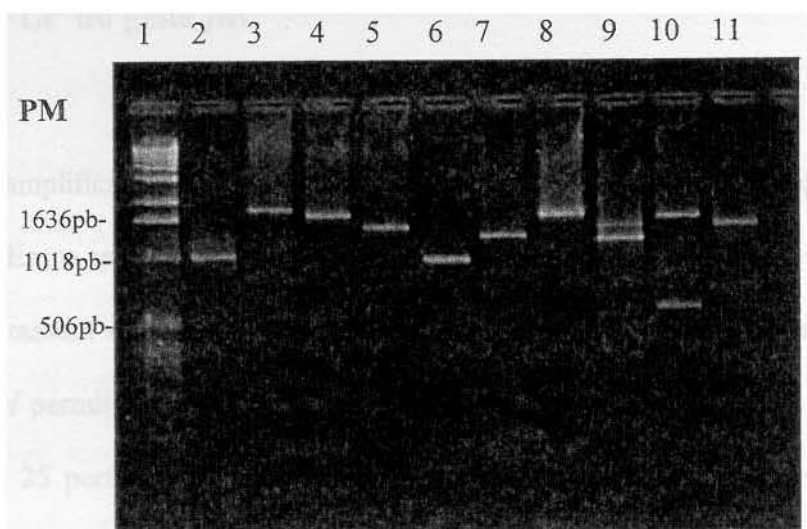


Figura 9. Gel de agarose (1,5%) com o produto de amplificação do gene *fliC* (flagelina) de linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária. **1:** marcador de peso molecular 1Kb. **2:** linhagem N1. **3:** linhagem S6. **4:** linhagem N9. **5:** linhagem N22. **6:** linhagem O4. **7:** linhagem S23. **8:** linhagem N24. **9:** linhagem S9. **10:** linhagem SCI9. **11:** linhagem N20.

7. Obtenção de RFLP do gene *fliC*

O produto de amplificação do gene *fliC* foi digerido com a enzima de restrição *RsaI* para a obtenção de RFLP. Entre as 46 linhagens *fliC*⁺, apenas a linhagem S8 não apresentou sítios de restrição que possibilitassem a digestão com a enzima *RsaI*. Nas demais linhagens, o corte de *fliC* com a enzima *RsaI* permitiu a obtenção de fragmentos de restrição.

Foram obtidos 25 perfis de polimorfismos de fragmentos de restrição entre as linhagens *fliC*⁺, que estão ilustrados nas figuras 10 e 11. Diferentes perfis de RFLPs foram obtidos entre as linhagens móveis. Por outro lado, seis linhagens não móveis apresentaram o perfil eletroforético igual: a linhagem não móvel SCI11 apresentou o mesmo perfil de RFLP de *fliC* da linhagem SCI14, também não móvel; além disso, as linhagens não móveis SCI6, SCI12, SCI13 e SCI15 também apresentaram o mesmo perfil de RFLP. Contudo, a linhagem não móvel SCI10, exibiu o mesmo perfil de RFLP apresentado pelas linhagens móveis S1, S9 e S13. Da mesma forma, a linhagem O5 exibiu o mesmo perfil de RFLP das linhagens móveis O6, O7 e O9.

A partir destes resultados foi possível estabelecer a comparação clonal destas linhagens através da utilização do *software* Popgene (versão 3.2) que utiliza a medida de distância genética de Nei (1972) para a obtenção de dendrogramas que ilustram a diversidade genética de uma população. A análise do dendrograma obtido (Figura 12), permitiu estabelecer a estrutura clonal desta população bacteriana e comparar com as características biológicas destas linhagens (adesão em epitélio de traquéia, em células HeLa e Hep-2 e patogenicidade).

O dendrograma obtido é constituído por 6 ramos principais (A - F) (figura 12).

O ramo A está dividido em 2 ramos denominados A.1 e A.2 (figura 12). O ramo A.1 é formado por 13 linhagens: 7 (54%) isoladas de aves saudáveis, uma isolada de ave com septicemia (7%) e cinco linhagens isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada (39%). A linhagem não patogênica N1 e a linhagem patogênica S16, caracterizadas por apresentar adesão manose resistente em epitélio de traquéia, e as linhagens não patogênicas N21, N22 e N29, com adesão negativa em epitélio de traquéia, formam um grupo de linhagens geneticamente próximas dentro do ramo A.1. Além disso, a linhagem N11, que apresenta adesão manose sensível em epitélio traqueal de aves, juntamente com as linhagens não patogênicas geneticamente idênticas N14 (que apresenta adesão manose sensível em epitélio de traquéia) e N15 (com adesão negativa em epitélio de traquéia) e com cinco linhagens patogênicas isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada [quatro com adesão manose resistente em epitélio de traquéia (SCI11, SCI13, SCI14, SCI15) e uma com adesão manose sensível – SCI8)], também geneticamente idênticas, formam outro grupo de linhagens dentro do ramo A.1 (Figura 12 e Tabela XII).

Por outro lado, o ramo A.2 (Figura 12) é constituído por 20 linhagens das quais nove (45%) foram isoladas de aves saudáveis, duas isoladas de aves com onfalite (10%), oito (40%) linhagens isoladas de aves com septicemia e uma (5%) linhagem isolada de ave com síndrome da cabeça inchada. Estas linhagens foram organizadas em dois grandes grupos dentro do ramo A.2: A.2a e A.2b. O grupo A.2 a é formado por 13 das 20 linhagens que constituem o grupo A.2: a linhagem N3 (adesão MR em epitélio traqueal de aves), juntamente com a linhagens N10 (adesão MR em epitélio traqueal de aves), com as linhagens geneticamente idênticas N23 e N25 (adesão negativa em epitélio de traquéia de aves), com a linhagem O4 (adesão negativa em epitélio de traquéia de aves) e as linhagens geneticamente idênticas S5 (adesão manose resistente em epitélio traqueal de aves) e S6 (adesão manose sensível em epitélio de traquéia de aves) formam um grupo de linhagens próximas dentro do grupo A.2. a. Outro grupo bacteriano,

formado por linhagens geneticamente próximas dentro do grupo A.2.a, foi caracterizado por ser constituído por três linhagens isoladas de aves saudáveis (N4, com adesão manose sensível em epitélio de traquéia, linhagem N8 que não apresenta adesão e N9 que também apresenta adesão manose em epitélio traqueal de aves) e por três linhagens isoladas de aves com septicemia, na qual uma apresenta adesão manose resistente em epitélio traqueal de aves (linhagem S23) e duas são geneticamente idênticas (S17 e S18, onde S17 apresenta adesão manose resistente em epitélio de traquéia de aves).

O ramo A.2.b é formado por um grupo de sete linhagens das 20 que constituem o grupo A.2. Este grupo é formado pela linhagem N17 (adesão manose resistente em epitélio traqueal de aves), por três linhagens patogênicas isoladas de aves com septicemia e por uma linhagem patogênica isolada de aves com síndrome da cabeça inchada que são geneticamente idênticas (S1, S9, S13, SCI10), e pelas linhagens O1 e N20 (que apresentam adesão manose sensível em epitélio traqueal de aves). O grupo clonal formado pelas linhagens S1, S9, S13 e SCI10 é caracterizado por apresentar adesão manose resistente em células Hep-2.

O ramo B (Figura 12) é formado por duas linhagens patogênicas isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada geneticamente idênticas: a linhagem SCI11 que apresenta adesão manose resistente em epitélio traqueal de aves e SCI14 que não apresenta adesão neste tecido.

O ramo C é constituído por quatro linhagens isoladas de aves com onfalite, que são geneticamente idênticas, sendo que três não apresentam adesão em epitélio de traquéia de aves e uma linhagem (O5) possui adesão manose sensível neste tecido (Figura 12 e tabela XII). Nenhuma destas linhagens apresentou adesão em células HeLa e Hep-2.

O ramo D é formado apenas pela linhagem N24 que não apresenta adesão em epitélio traqueal de aves (figura 12 e tabela XII). Contudo, todas as linhagens deste grupo apresentam adesão manose resistente em células HeLa e Hep-2.

O ramo E é formado por quatro linhagens patogênicas isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada que são geneticamente idênticas. Entre as linhagens formadoras do ramo E apenas SCI13 apresenta adesão em epitélio de traquéia de aves (adesão manose sensível) e as demais não apresentam adesão neste tecido (Figura 12 e Tabela XII).

O ramo F é formado por duas linhagens isoladas de aves com onfalite que são geneticamente idênticas e que apresentam adesão negativa em epitélio de traquéia de aves (Figura 12 e Tabela XII).

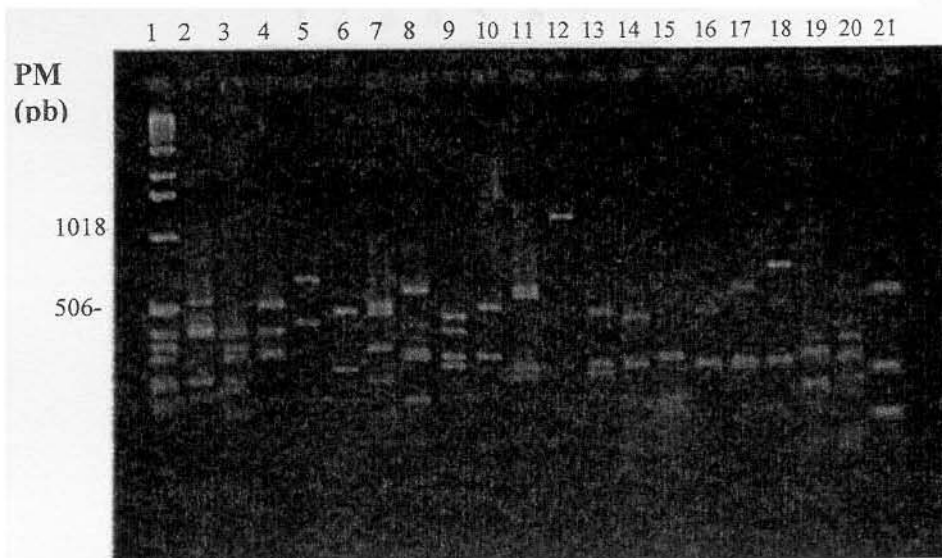


Figura 10: Gel de agarose (1,5%) com os perfis de RFLP, obtidos a partir da digestão de *fliC* com a enzima *RsaI*, observados na linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária. **1:** Padrão de peso molecular de 1,0Kb. **2:** Linhagem SCI1. **3:** Linhagem SCI6. **4:** Linhagem SCI10. **5:** Linhagem SCI11. **6:** Linhagem O1. **7:** Linhagem O2. **8:** Linhagem O4. **9:** Linhagem O5. **10:** Linhagem S13. **11:** Linhagem S5. **12:** Linhagem S8. **13:** Linhagem S16. **14:** Linhagem S17. **15:** Linhagem S23. **16:** Linhagem N1. **17:** Linhagem N3. **18:** Linhagem N4. **19:** Linhagem N8. **20:** Linhagem N9. **21:** Linhagem N10.

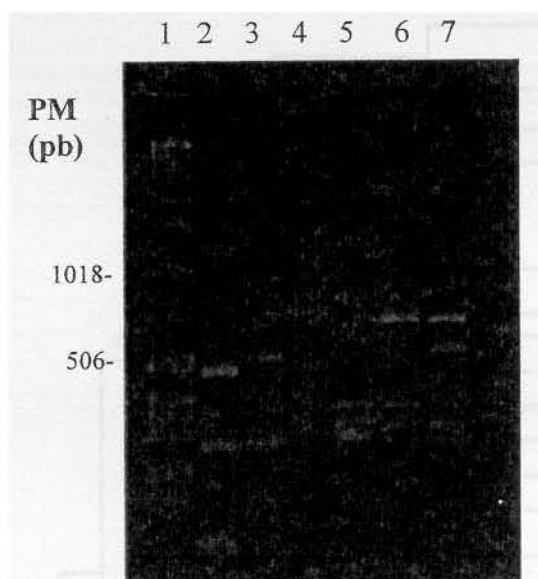


Figura 11: Gel de agarose (1,5%) com os perfis de RFLP, obtidos a partir da digestão de *fliC* com a enzima *RsaI*, observados na linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária. **1:** Padrão de peso molecular de 1,0Kb. **2:** Linhagem N11. **3:** Linhagem N15. **4:** Linhagem N17. **5:** Linhagem N20. **6:** Linhagem N24. **7:** Linhagem N29.

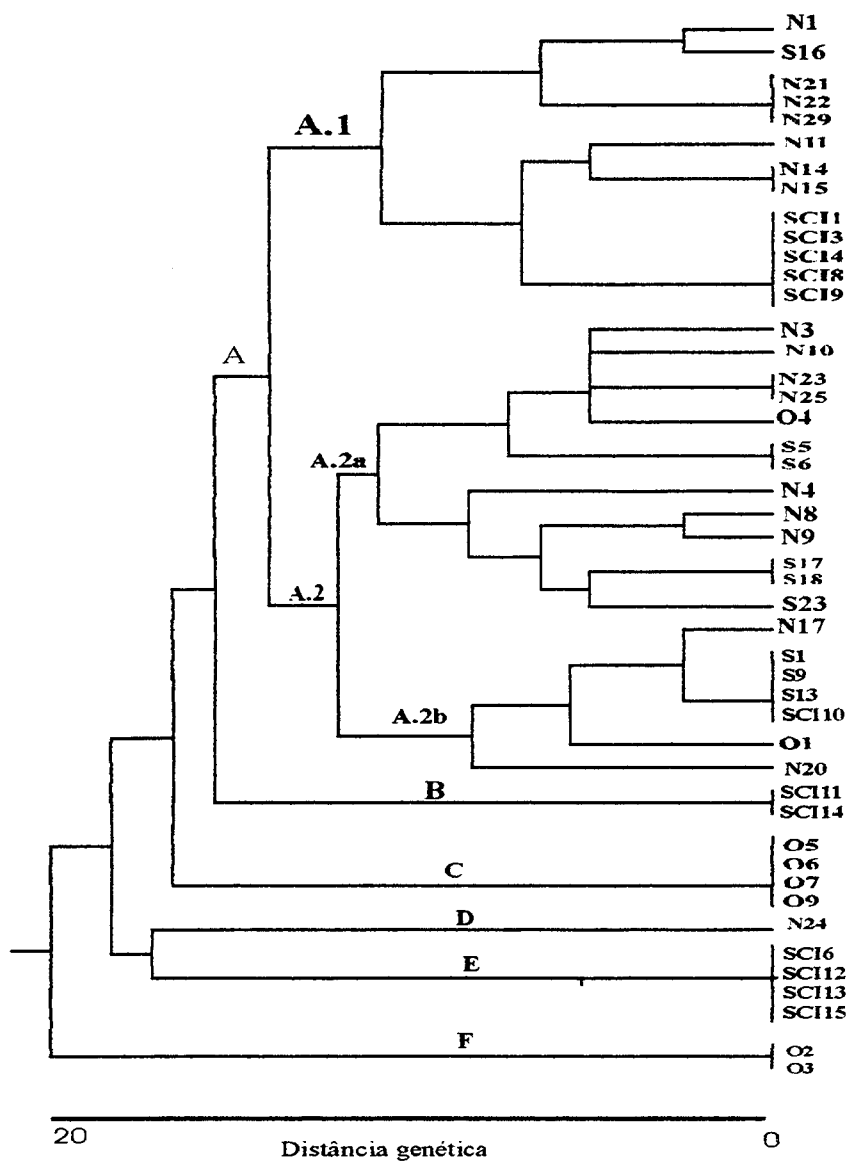


Figura 12. Dendrograma gerado a partir do RFLP do gene *fliC* através da utilização do método UPGMA (POPEGENE 6.2).

Tabela XII. Adesão em epitélio traqueal de aves, em cultura de células HeLa e Hep2 e patogenicidade das linhagens agrupadas no dendrograma obtido a partir dos perfis de RFLPs do gene *fliC*.

Linhagens	Adesão em anéis de traquéia	Adesão em células HeLa	Adesão em células Hep-2	Patogenicidade U.F.C./mL
N1	MR	MR	MR	$>10^{10}$
S16	MR	-	-	10^7
N21	-	-	-	$>10^{10}$
N22	-	MS	-	$>10^{10}$
N29	-	-	-	$>10^{10}$
N11	MS	-	-	$>10^{10}$
N14	MS	MS	MR	$>10^{10}$
N15	-	-	MS	$>10^{10}$
SCI1	MR	MR	MR	10^7
SCI3	MR	MR	MR	$10^7 > X > 10^9$
SCI4	MR	MR	MR	$10^7 > X > 10^9$
SCI8	MS	-	-	10^7
SCI9	MR	MS	MS	10^9
N3	MR	MR	MR	$>10^{10}$
N10	MR	-	-	$>10^{10}$
N23	MR	-	MS	$>10^{10}$
N25	-	MS	MS	$>10^{10}$
O4	-	-	-	$>10^{10}$
S5	MR	MR	-	10^9
S6	MS	MR	MR	$>10^{10}$
N4	MS	-	-	$>10^{10}$
N8	MS	-	MS	$>10^{10}$
N9	MS	-	MR	$>10^{10}$
S17	MR	-	-	$>10^{10}$
S18	-	-	-	$>10^{10}$
S23	MR	MS	MS	$>10^{10}$
N17	MS	MS	MR	$>10^{10}$
S1	-	MR	MR	10^9
S9	MR	MR	MR	10^8
S13	MR	MR	MR	10^5
SCI10	MR	MR	MR	10^7
O1	-	-	-	$>10^{10}$
N20	MS	MS	MR	$>10^{10}$
SCI11	-	MS	MS	10^7
SCI14	MS	MR	MR	10^7
O5	MS	MS	-	$>10^{10}$
O6	-	-	-	$>10^{10}$
O7	-	-	-	$>10^{10}$
O9	-	-	-	$>10^{10}$
N24	-	MR	MR	$>10^{10}$
SCI6	-	MR	MR	$>10^{10}$
SCI12	-	MR	MR	$10^7 > X > 10^9$
SCI13	MS	MR	MR	10^9
SCI15	-	MR	MR	10^7
O2	-	MR	MR	$>10^{10}$
O3	-	-	-	$>10^{10}$

Tabela XIII: Adesão em células HeLa, Hep-2 e adesão em anéis de traquéia de embriões de aves de linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária isoladas de aves saudáveis (N1-N30), de aves com septicemia (S1-S24), originárias de aves com síndrome da cabeça inchada (SCI1-SCI4, SCI6-SCI15) e isoladas de aves com onfalite (O1-O11) na presença (c/m) e ausência (s/m) de D-manose (MR: adesão manose resistente; MS: adesão manose sensível; AA: adesão agregativa; DA: adesão difusa; LA: adesão localizada).

Linhagens	Células HeLa		Células Hep-2		Anéis de traquéia de embriões de aves
	S/m	C/m	S/m	C/m	
N1	AA	LA	AA	AA	MR
N2	DA	DA	AA	-	MR
N3	LA	DA	AA	-	MR
N4	-	-	-	-	MS
N5	DA	-	AA	LA	MS
N6	DA	-	DA	DA	MS
N7	-	-	AA	LA	MR
N8	-	-	LA	-	MS
N9	-	-	DA	DA	MS
N10	-	-	-	-	MR
N11	-	-	-	-	MS
N12	-	-	-	-	MR
N13	-	-	LA	LA	MR
N14	DA	-	DA	DA	MS
N15	-	-	LA	-	-
N16	LA	-	DA	LA	MR
N17	DA	-	DA	DA	MS
N18	-	DA	LA	DA	-
N19	DA	DA	DA	DA	MR
N20	DA	-	DA	LA	MS
N21	-	-	LA	DA	-
N22	DA	-	LA	DA	-
N23	-	-	DA	-	MR
N24	AA	-	DA	DA	-
N25	DA	-	DA	-	-
N26	AA	DA	LA	DA	-
N27	-	-	DA	DA	MS
N28	AA	-	DA	LA	-
N29	-	-	DA	-	-
N30	DA	DA	DA	DA	-
S1	LA	LA	DA	DA	-
S2	DA	LA	-	-	MS
S3	LA	DA	DA	DA	MR
S4	DA	LA	DA	DA	MS
S5	DA	DA	-	-	MR
S6	DA	DA	DA	DA	MS
S7	AA	DA	LA	LA	-
S8	DA	AA	DA	DA	-
S9	-	DA	DA	DA	MR
S10	DA	AA	-	-	-
S11	AA	-	-	-	-
S12	-	-	-	-	-
S13	AA	AA	AA	AA	MR
S14	LA	AA	DA	DA	-
S15	LA	LA	DA	DA	MR
S16	-	-	-	-	MR
S17	-	-	-	-	MR
S18	-	-	-	-	-
S19	-	-	-	-	-
S20	DA	-	DA	-	-
S21	DA	-	DA	-	-
S22	DA	DA	DA	-	-
S23	DA	-	DA	-	MR
S24	-	-	-	-	-
SCI1	DA	DA	DA	DA	MS
SCI2	DA	DA	AA	DA	MR
SCI3	DA	DA	AA	AA	MR
SCI4	DA	DA	DA	DA	MR
SCI6	AA	LA	DA	DA	-
SCI7	DA	DA	DA	DA	MR
SCI8	ND	ND	ND	ND	MS
SCI9	AA	-	DA	-	MR
SCI10	DA	DA	AA	DA	MR
SCI11	DA	-	AA	-	-
SCI12	DA	DA	DA	DA	-
SCI13	DA	DA	DA	DA	MS
SCI14	DA	DA	DA	DA	MS
SCI15	DA	DA	DA	DA	-
O1	-	-	-	-	-
O2	AA	AA	AA	AA	-
O3	-	-	-	-	-
O4	LA	LA	-	-	-
O5	-	-	-	-	MS
O6	-	-	-	-	-
O7	-	-	-	-	-
O8	-	-	-	-	MS
O9	-	-	-	-	-
O10	-	-	-	-	MS
O11	LA	LA	LA	LA	MR

Discussão

A ocorrência de adesão positiva em anéis de traquéia de embriões de aves na maioria das linhagens deste estudo demonstra que estas linhagens possuem adesinas em suas superfícies com capacidades de mediar a ligação bacteriana ao epitélio traqueal de aves e que, possivelmente, podem ser responsáveis pela colonização inicial do trato respiratório superior de aves por APEC.

A adesão em epitélio de traquéia de aves é considerada um fator de patogenicidade bacteriana de APEC devido à observação de que infecções de aves por linhagens patogênicas de *Escherichia coli* ocorrem geralmente via trato respiratório superior (*in*: Dho- Moulin e Fairbrother, 1999). Contudo, a ocorrência de adesão em 66% das linhagens isoladas de aves saudáveis sugere que, apesar de constituir o passo inicial de infecções por APEC, outros fatores de virulência que podem estar presentes nas linhagens isoladas de aves septicêmicas, com síndrome da cabeça inchada ou onfalite, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento destas infecções.

Estudos relacionados à colonização do trato respiratório superior de aves por APEC têm demonstrado que a fimbria tipo 1 possivelmente é a fimbria responsável pela adesão bacteriana em epitélio traqueal de aves (Wooley *et al.*, 1998; La Ragione *et al.*, 2000a e 2000b). A ocorrência de adesão manose sensível em epitélio de traquéia apresentada nas linhagens analisadas também pode confirmar que a ligação bacteriana na superfície epitelial de traquéia de aves pode ser mediada pela fimbria tipo 1. Entretanto, a ocorrência de adesão manose resistente observada em várias linhagens, sugere que existem outras adesinas presentes na superfície

bacteriana destas linhagens e que podem também ser responsáveis pela colonização inicial do trato respiratório superior de aves. A presença de adesão manose resistente em epitélio traqueal exibida por linhagens APEC também foi observada em estudos realizados por Dozois *et al.* (1995) e Vidotto *et al.*, (1997), que excluem a possibilidade da ocorrência de adesão manose resistente em epitélio traqueal de aves ser mediada pela fimbria P. Assim, estes estudos, juntamente com nossos resultados, sugerem que existem adesinas ainda não identificadas e descritas em APEC que podem ser responsáveis pela colonização do trato respiratório de aves por *E. coli*.

Os resultados obtidos no teste de microhemaglutinação mostram que diferentes tipos de hemaglutininas podem estar presentes na superfície bacteriana das linhagens APEC analisadas neste estudo. A ocorrência de hemaglutinação manose sensível em grande parte das linhagens estudadas (presente em 68 das 79 linhagens, ou seja, 86%) demonstra que, como observado em *E. coli* patogênicas para mamíferos (Mooi e De Graaf, 1985; Mol e Oudega, 1996; Nataro e Kaper, 1998), a fimbria tipo 1 é a adesina fimbrial mais frequentemente observada em linhagens de *E. coli* de origem aviária. Por outro lado, a ocorrência de hemaglutinação manose resistente para os diferentes eritrócitos testados, após o cultivo em cinco meios de cultura diferentes, sugere que existem estruturas com diferentes capacidades de hemaglutinação presentes na superfície bacteriana destas linhagens.

Não foi possível relacionar os padrões de hemaglutinação observados em nossos estudos à expressão de fimbrias descritas em APEC, pois, até o momento, poucos padrões de hemaglutinação foram descritos e relacionados à expressão de fimbrias presentes em *E. coli* aviária. É conhecido que a fimbria “*curli*” e a hemaglutinina TSH apresentam hemaglutinação manose resistente de eritrócitos de galinha quando o cultivo das linhagens é realizado em meio CFA a 26°C (Olsén *et al.*, 1993; Provence e Curtiss III, 1994). Apesar das linhagens N16, S19 e

S14 (tabela VII) aglutinarem eritrócitos de galinha quando cultivadas em CFA, não foi possível relacionar este fenótipo à expressão de fimbria “*curli*” ou hemaglutinina TSH, pois o teste de microhemaglutinação foi realizado com cultivo bacteriano a 37°C. Além disso, destas linhagens, apenas S14 apresentou o gene *csgA* (“*curli*”) quando analisada por PCR.

Apesar de ainda não serem conhecidos padrões de hemaglutinação relacionados à presença de fímbrias na superfície de linhagens de *E. coli* de origem aviária, foram observados dois padrões de hemaglutinação semelhantes ao descrito para linhagens de *E. coli* de origem humana: CFAII/CS3 (Mooi e De Graaf, 1985) e FB171 (Girón *et al.*, 1993). É provável que estes resultados sugiram a existência da transmissão de fatores de patogenicidade entre linhagens de *E. coli* originárias de diferentes animais. Contudo, como não foi realizada a caracterização molecular das estruturas que apresentaram estas capacidades hemaglutinantes, não é possível afirmar que as adesinas presentes na superfície das linhagens de APEC analisadas neste estudo correspondam às adesinas CFAII/CS3 e FB71.

Os diferentes padrões de hemaglutinação observados neste trabalho demonstram, juntamente com a ocorrência de adesão em epitélio traqueal de aves, que diferentes adesinas podem ser encontradas na superfície bacteriana de linhagens de *E. coli* de origem aviária.

A diversidade de estruturas fímbrias presentes em APEC analisadas neste estudo é, também, demonstrada pelos resultados obtidos na visualização de fímbrias em microscopia eletrônica de transmissão. A visualização de fímbrias em linhagens com adesão positiva podem demonstrar a relação destas estruturas com a colonização do trato respiratório superior. Por outro lado, a presença de fímbrias em linhagens com adesão negativa e com hemaglutinação positiva sugere, que estas fímbrias podem estar relacionadas à colonização de outros tecidos e não do epitélio traqueal de aves.

A ausência de fimbrias em linhagens que apresentaram adesão e/ou hemaglutinação pode ser resultado das condições de cultivo utilizadas para a realização da visualização das linhagens em microscopia eletrônica de transmissão que não possibilitaram a expressão destas adesinas ou, também, devido à impossibilidade do método em contrastar e permitir a visualização destas adesinas, ou estas estruturas não apresentam forma fibrilar.

A detecção dos genes relacionados à expressão de fimbrias descritas em APEC demonstrou que o gene *papA* (fimbria P) foi o menos freqüente entre as linhagens analisadas, sendo observado apenas entre as linhagens isoladas de aves com septicemia e síndrome da cabeça inchada. Como observado por Dozois *et al.* (1996), a ocorrência do gene *papA* em freqüências mais elevadas em isolados clínicos do que entre as linhagens comensais, sugere que este gene pode estar relacionado à patogenicidade de APEC.

A grande freqüência do gene *fimA*, juntamente com a observação de adesão e hemaglutinação manose sensível, também é indicativo da ocorrência de fimbria tipo 1 entre as linhagens patogênicas e não patogênicas de origem aviárias deste estudo. Além disso, a ocorrência de linhagens *fimA*- com adesão e/ou hemaglutinação manose sensível, demonstram que as linhagens APEC analisadas neste estudo expressam fimbrias “type 1- like” que são adesinas com capacidades de adesão e hemaglutinação semelhantes à fimbria tipo 1 (Dho-Moulin *et al.*, 1990).

Igualmente ao observado por Maurer *et al.* (1998), que detectaram os genes *crl* e *tsh* mais freqüentemente entre isolados clínicos de *E. coli* de origem aviária (97% dos isolados clínicos apresentaram o gene *crl* e 46% destes isolados apresentaram o gene *tsh*), a freqüência destes genes também foi maior entre os isolados clínicos analisados neste estudo (36% das linhagens isoladas de processos infecciosos apresentaram o gene *crl*, sendo que apenas 10% das linhagens isoladas de aves saudáveis apresentaram este gene; o gene *tsh*, por outro lado, foi observado em

16% das linhagens isoladas de aves doentes e em 10% das linhagens isoladas de aves saudáveis). Apesar de Maurer *et al.* (1998) considerarem *csgA* um gene de distribuição ampla em linhagens de *E. coli* de origem aviária, por detectá-lo em 100% dos isolados clínicos e também em todas as linhagens isoladas da flora normal de aves, o mesmo não foi por nós observado entre as linhagens isoladas de aves saudáveis, analisadas neste estudo. Além disso, a presença de *tsh* em duas destas linhagens contraria as observações realizadas por Maurer *et al.* (1998) que propõem a utilização deste gene como marcador molecular para identificação de linhagens patogênicas de *E. coli* em aves por tê-lo detectado em 46% dos isolados clínicos e em nenhuma linhagem isolada da flora normal de aves.

A detecção dos genes por PCR, que podem indicar a presença de fimbrias descritas em APEC, demonstrou que as linhagens relacionadas aos processos infecciosos geralmente apresentaram mais de um dos genes estudados, ao contrário das linhagens isoladas de aves saudáveis que, na maioria, apresentaram apenas um dos genes analisados. Apesar disso, não foi possível estabelecer uma correlação entre o genótipo apresentado pelas linhagens e a ocorrência de adesão em traquéia ou determinado padrão de hemaglutinação.

A ocorrência de linhagens com capacidades de adesão e/ou aglutinação e que não apresentaram nenhum dos genes estudados (linhagens S19 e SCI13, por exemplo) também demonstra a diversidade de adesinas presentes na superfície bacteriana das linhagens analisadas neste estudo, que possivelmente ainda não foram descritas em APEC.

Os resultados obtidos no teste de motilidade sugerem que a expressão de flagelos e motilidade podem não estar diretamente relacionadas à patogenicidade bacteriana, não constituindo um fator de patogenicidade como proposto por Parreira *et al.* (1998). Provavelmente, a motilidade pode estar indiretamente relacionada à patogenicidade de APEC constituindo um fator adicional que contribui para a virulência bacteriana destas linhagens.

Wooley *et al.* (1998) propõem que a colonização da traquéia por APEC aumenta quando a linhagem é móvel. Apesar disso, não encontramos correlação entre a ocorrência de flagelo e/ou motilidade e a presença de adesão bacteriana ao epitélio traqueal. Estudos realizados por La Ragione *et al.* (2000a e 2000b) sugerem que o flagelo não está diretamente relacionado à colonização bacteriana do epitélio traqueal mas contribui indiretamente para o estabelecimento da infecção por APEC em aves, por possibilitar a penetração do muco por estas linhagens.

A obtenção de fragmentos com tamanhos variáveis a partir da amplificação do gene *fliC* mostra que este gene é altamente polimórfico entre as linhagens analisadas neste estudo (Figura 9). Assim, como observado por Fields *et al.* (1997), em estudos realizados em linhagens de EPEC, a variabilidade dos produtos de amplificação do gene *fliC* pode ser resultado da variabilidade do antígeno H que é constituído de uma única proteína (flagelina) produzida pelo gene *fliC* (Ku wagima *et al.* 1989). Estudos de sequenciamento direto do gene *fliC* em linhagens patogênicas de *E. coli* mostram que as regiões N- e C- terminais dos alelos são altamente conservadas enquanto a região central é extremamente polimórfica e variável. Por constituir o principal componente antigênico da flagelina, a região central pode ser um alvo para a seleção diversificadora que favorece a existência de novas variantes do antígeno H, provavelmente por aumentar a habilidade da bactéria em evadir-se da imunidade e de colonizar novos hospedeiros (Reid *et al.*, 1999).

A ocorrência polimórfica do gene *fliC* em várias linhagens não móveis (Tabela XI) confirma que a variabilidade genética de *fliC* é responsável pela variabilidade antigênica de H e não pela motilidade bacteriana (Fields *et al.*, 1997; Reid *et al.*, 1999). Apesar de *fliC* ser um dos componentes genéticos estruturais do filamento flagelar bacteriano, a rotação da organela é regulada pela atividade de duas proteínas adicionais (*Mot A* e *MotB*), que formam um anel ao redor do corpo basal constituindo canais de prótons do periplasma ao citoplasma, fornecendo

energia para a rotação flagelar e, conseqüentemente, para motilidade bacteriana (Fernandez e Berenguer, 2000). A ocorrência de várias linhagens *fliC*⁺ e flagelo –, (Tabela XI) é resultado da grande complexidade genética envolvida na constituição flagelar em *E. coli*, que requer um sistema genético envolvendo cerca de 40 genes distribuídos entre 15 a 17 operons organizados em quatro regiões principais: região I que contém genes estruturais; região II que codifica proteínas responsáveis pela reunião e organização da estrutura e regiões IIIa e IIIb que codificam genes reguladores (Fernandez e Berenguer, 2000).

Igualmente ao observado por Fields *et al.* (1997), em linhagens de EPEC de origem humana, a ocorrência dos diferentes perfis de RFLPs observados nestes estudo demonstram a diversidade genética de *fliC* dentro das linhagens de *E. coli* de origem aviária.

A utilização de perfis de RFLPs de *fliC* para a comparação genética entre as linhagens portadoras deste gene, possibilitou a realização de análise de agrupamento destas linhagens e, posteriormente, a verificação de ocorrência de clones bacterianos dentro da população estudada. Contudo, este método de comparação genética não possibilitou a análise de toda a população bacteriana estudada, uma vez que somente 46 linhagens (58%) são portadores do gene *fliC*.

A análise do dendrograma obtido neste estudo permitiu verificar que houve um agrupamento de clones patogênicos juntamente com grupos formados por linhagens não patogênicas. Isto pode ser observado dentro do ramo A, onde foi agrupada a maior parte das linhagens isoladas de aves saudáveis juntamente com grupos constituídos por linhagens patogênicas: dentro do ramo A.1 (Figura 12), por exemplo, há um grupo clonal de bactérias patogênicas originárias de aves com síndrome da cabeça inchada (SCI1, SCI3, SCI4, SCI 8 e SCI9), que está dentro de um grupo formado por sete linhagens não patogênicas isoladas de aves saudáveis (N1,N21,N22,N29,N11,14,N15). Da mesma forma, no ramo A.2 há também um grupo clonal de linhagens patogênicas (linhagens S1, S9, S13 e SCI10) que está dentro de um grupo

formado por 10 linhagens não patogênicas isoladas de aves saudáveis (N3, N10, N23, N25, N4, N8, N9, N17). Esta proximidade genética de *fliC* entre linhagens patogênicas e não patogênicas, sugere que pequenas variações presentes neste gene podem determinar diferenças dos antígenos flagelares de linhagens patogênicas e não patogênicas em *E. coli* de origem aviária. A comparação dos perfis de RFLP de *fliC* com a tipagem do antígeno flagelar destas linhagens (não realizado neste trabalho) e com a distância genética apresentada entre os clones patogênicos e não patogênicos é necessária para verificar se as diferenças observadas em *fliC* estão relacionadas à seleção de antígenos flagelares específicos de grupos clonais patogênicos em *E. coli* de origem aviária.

A formação de grupos clonais constituídos por linhagens patogênicas a partir da comparação genética de *fliC* demonstra, como observado em EPEC de origem humana (Fields *et al.*, 1997), a relação da variabilidade deste gene com a ocorrência de clones patogênicos em APEC.

A ocorrência de adesão em epitélio de traquéia em 73% das linhagens agrupadas no ramo A (24 de 33 linhagens – Figura 12 e Tabela XII) e de adesão negativa neste tecido em 85% das linhagens (11 de 13 linhagens) encontradas nos demais ramos (B, C, D, E, F) demonstra que a comparação do RFLP de *fliC* permitiu separar linhagens com adesão positiva em traquéia de linhagens que apresentaram adesão negativa.

A presença de grupos clonais patogênicos e de grupos não patogênicos, encontrados dentro do ramo A, sugere que a adesão em traquéia pode ser o passo inicial para o estabelecimento da colonização do hospedeiro e infecção, mas que outros fatores de virulência, provavelmente presentes nas linhagens encontradas nos grupos clonais patogênicos, são necessários para o desenvolvimento de patologias.

A ocorrência de grupos clonais patogênicos formados por linhagens isoladas de aves com síndrome da cabeça inchada que apresentaram adesão em células HeLa e Hep-2 dentro dos ramos caracterizados por apresentar linhagens com adesão negativa em traquéia (B, C, D, e, F – Figura 12), sugere que adesinas que não estão relacionadas à colonização do epitélio traqueal de aves possivelmente estão envolvidas na patogenicidade destas linhagens. Provavelmente, estas adesinas estão relacionadas à colonização de outros tecidos envolvidos no estabelecimento de infecções causadas por estas linhagens. Da mesma forma, ocorrência de grupos clonais formados por linhagens isoladas de aves com onfalite com valores de LD_{50} maiores que 10^{10} (consideradas não patogênicas neste estudo) que não apresentaram adesão em nenhum dos tipos celulares testados (traquéia, HeLa e Hep-2) também sugere que adesinas que não medeiam a ligação bacteriana em epitélio de traquéia estão relacionadas à patogenicidade de APEC.

Assim, a análise da estrutura clonal da população de *E. coli* de origem aviária realizada neste estudo permitiu concluir que a patogenicidade de APEC pode ser resultado de processos multifatoriais que podem envolver a presença de adesinas na superfície bacteriana que permitem a colonização de tecidos do hospedeiro, de outros fatores de virulência e da suscetibilidade do hospedeiro.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram-nos concluir que:

(i) A capacidade de adesão em epitélio traqueal de aves, embora seja considerada um pré-requisito para o desenvolvimento de infecções causadas por APEC, não é um fator essencial à patogenicidade bacteriana destas linhagens;

(ii) A ocorrência de adesão manose resistente em epitélio de traquéia de aves sugere que outras adesinas, além da fimbria tipo 1, possibilitem a ligação bacteriana no epitélio traqueal de aves;

(iii) A ocorrência de adesão manose resistente, e de diferentes padrões de hemaglutinação manose resistente, sugerem que existe uma grande diversidade de adesinas presentes na superfície das linhagens bacterianas estudadas;

(iv) A detecção de genes relacionados à presença de fimbrias em APEC, principalmente nas linhagens patogênicas demonstra a relação destas estruturas à patogenicidade de APEC.

(v) A ocorrência de linhagens com adesão manose resistente em epitélio traqueal de aves que não apresentou nenhum dos genes analisados, juntamente com o padrão de hemaglutinação observado nestas linhagens, sugerem que existem muitas adesinas na superfície destas linhagens que ainda não foram descritas e caracterizadas.

Os resultados obtidos no teste de motilidade e observação de flagelos em microscopia eletrônica sugerem que a expressão de flagelos e motilidade podem não estar diretamente relacionadas à patogenicidade bacteriana em APEC

A obtenção da estrutura clonal a partir da análise genética de *fliC* permitiu verificar que existem proximidades genéticas entre linhagens patogênicas e não patogênicas, ao menos para o gene *fliC*.

Finalmente, a análise da estrutura clonal da população e dos dados obtidos nos testes realizados neste estudo, permitem concluir que a patogenicidade de APEC pode ser resultado de processos multifatoriais que, possivelmente, envolvem a colonização de tecidos do hospedeiro, de outros fatores de virulência que ainda devem ser pesquisados e da suscetibilidade do hospedeiro.

Referências bibliográficas

- ALLINSON, C.; COLEMAN, N.; JONES, P.; HUGHES, C. (1992). Ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation. *Infect. Immun.* **60**. 4740-4746.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D.D.; SMITH, J.A.; SEIDMAN, J. G.; STRUHL, K. (1988). *Curr. Protoc. in Mol. Biol.* Green Publishing Associates, Brooklyn, NY.
- COLLINS, S. K.; DOIG, P. C.; DORAN, J. L.; CLOUTHIER, S.; TRUST, T. J.; KAY, W. W. (1993). Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J. Bact.* **175**(1). 12-18.
- DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J.B. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli*. Review article. *Vet. Res.* **30**. 299-316.
- DHO-MOULIN, M.; VAN DEN BOSCH, J. F.; GIRARDEAU, J.P.; BRÉE, A.; BARAT, T.; LAFONT, J. P. (1990). Surface antigens from *Escherichia coli* O2 and O78 strains of avian origin. *Infect. Immun.* **58** (3). 740-745.

Referências Bibliográficas

- DOZOIS, C. M.; HAREL, J.; FAIRBROTHER, J. M. (1996). P-fimbriae-producing septicaemic *Escherichia coli* from poultry posses *fel-related* gene clusters whereas *pap*-hybridizing P-fimbriae-negative strains have partial or divergent P fimbrial gene clusters. *Microb.* **142**. 2759-2766.
- DOZOIS, C.M.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; FAIRBROTEHR, J.M.; DESAUTELS,C.; CURTISS III, R. (2000). Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity and *Immun.* **68**(7). 4145-4154.
- DOZOIS,C. M.; POURBAKHS, S. A.; FAIRBROTHER, J. M. (1995). Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet. Microb.* **45**. 297-309.
- EVANS, D. J.; EVANS, D. G.; YOUNG, L. S.; PITT, J. (1980). Hemagglutination typing of *Escherichia coli* definition seven hemagglutinations type. *J. Clin. Microb.* **12**. 235-242.
- FANTINATTI, F.; SILVEIRA, W.D.; CASTRO, A.F.P. (1994). Characteristics associated with pathogenicity an avian septicaemic *Escherichia coli* strains. *Vet. Microb.* **41**. 74-86.
- FERNANDEZ, L. A.; BERENGUER, J. (2000). Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microb.Rev.* **24**. 21-44.
- FIELDS, P. I.; BOM, H.; HUGHES, H. J.; HELSEL, L. O.; FENG, P.; SWAMINATHAN, B. (1997). Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and

Referências Bibliográficas

- development of a PCR-restriction fragment of length polymorphism test of identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. *J. Clin. Microbiol.* **35(5)**. 1066-1070.
- FINLAY, B. B.; FALKOW, S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* **53**. 210-230.
- GIRÓN, J. A.; HO, A. S. Y.; SCHOOLNIK, G. K. (1993). Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bact.* **175(22)**. 7391-7403.
- GUINEÉ, P. A. M.; VELDKAMP, J.; JANSEN, W. H. (1977). Improved minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **15**. 676-678.
- HAMMAR, M.; ARNQVIST, A.; BIAN, Z.; OLSÉN, A. NORMARK, S. (1995). Expression of two *csg* operons is required for productions of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K12. *Mol. Microb.* **18(4)**. 661-670.
- HOSCHÜTZKY, H.; LOTTSPEICH, F.; JANN, K. (1989). Isolation and characterization of the α -galactosyl-1,4 β -galactosyl-specific adhesin (P adhesin) from fimbriated *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **57(1)**. 76-81.
- ISAACSON, R. E. (1985). Pilus adhesins. In: SAVAGE, D. C.; FLETCHER, M. Bacterial adhesion: mechanisms and physiological significance. New York; London: Plenum Press.

Referências Bibliográficas

- JOHNSON, J.; STELL, A.L.; KASTER, N.; FASCHING, C.; O'BRYAN, T.O. (2001). Novel molecular variants of allele I of the *Escherichia coli* P fimbrial adhesin gene *papG*. *Infect. Immun.* **69**(4). 2318-2327.
- KNÖBL, T.; BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; GOMES, T. A T.; VIEIRA, M. A. M.; FERREIRA, C. S. A; FERREIRA, A. J. P. (2001) Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. *Vet. Microb.* **83**. 71-80.
- KUWAJIMA, G.; ASAKA, J.; FUJIWARA, T.; NODE, K.; KONDO, E. (1989). Nucleotide sequence of the *hag* *Escherichia coli*. *J.Bact.* **186** (3). 1479-1483.
- LA RAGIONE, R. M.; COOLEY, W. A; WOODWARD, M. J. (2000a). The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *J. Med. Microbiol.* **49** . 327-338.
- LA RAGIONE, R. M.; SAYER, A. R, WOODWARD, M. J. (2002b). The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O:78:K80 in the day-old-chick model. *Epidemiol. Infect.* **124**. 351-363
- LA-RAGIONE, R. M.; COLLIGHAN, R. J.; WOODWARD, M. J. (1999). Non-curliation of *Escherichia coli* O78:K80 isolates associated with IS insertion in *csgB* and reduced persistence in poultry infection. *FEMS Microb. Let.* **175**. 247-253.

Referências Bibliográficas

- MACNAB, R. M. (1987). Flagella. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. NEIDHARD, F. C.; INGRAHAM, J. L.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H.E. (eds.) Washington, D.C.:American Society for Microbiology, 733-759.
- MARC, D.; ARNÉ, P. (1998). Colonization ability and pathogenic properties of a *fim*- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res. Microb.* **149**. 473-485.
- MARC, D.; DHO-MOULIN, M. (1996). Analysis of the *fim* cluster of an avian O2 strain of *Escherichia coli*: serogroup-specific sites within *fimA* and nucleotide sequence of *fimI*. *J. Med. Microb.* **44**. 444-452.
- MAURER, J. J.; BROWN, T. P., STEFFENS, W. L.; THAYER, S. G. (1998). The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **42**. 106-118.
- MILLER, J. H. (1972). Experiments in molecular biology. Cold Spring Harbor Lab. Press.
- MOL, O.; OUDEGA, B. (1996). Molecular and structural aspects of fimbria biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. *FEMS Microb. Rev.* **19**. 25-52.
- MOOI, F. R.; DE GRAAF, F. K. (1985) Molecular biology of fimbriae of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Curr. Top. in Microb Immun.* **118**. 120-138.

Referências Bibliográficas

- MOON, H. W. (1990). Colonization factor antigens of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Curr. Top. in Microb. Immun.* **151**. 148-165.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11(1)**. 142-201.
- NEI, M. (1972). Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* **105**. 385-398.
- OLSÉN, A.; ARNQVIST, A.; HAMMAR, M.; SUKUPOLVI, S.; NORMARK, S. (1993). The R_pSo sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol. Microb.* **7**. 523-536.
- OLSÉN, A.; JONSSON, A.; NORMARK, S. (1989) Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*. **338**. 652-655.
- ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; BETTELHEIM K. A.; CHANDLER, M. E. (1975). Two new *Escherichia coli* O antigens ,O162 and O163, and one new H antigen, H56. Withdrawal of H antigen H50. *Acta Pathol. Microbiol Scand.* **83**. 121-124.
- PARREIRA, V. R.; ARNS, C. W.; YANO, T. (1998). Virulence factor of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome. *Avian Path.* **27**. 148-154.

Referências Bibliográficas

- PEEK, A. S.; SOUZA, V.; EGUIARTE, L. E.; GAUT, B. S. (2001) The interaction of protein structure, selection, and recombination on the evolution of the type -1 fimbrial major subunit (*fimA*) from *Escherichia coli*. *J. Mol. Evol.* **52**. 193-204.
- POURBAKHS, S. A.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; MARTINEAU-DOIZE, B.; FAIRBROTHER, J. B. (1997). Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* **22**. 231-341.
- PROVENCE, D. L.; CURTISS III, R. (1994). Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect and Immun.* **62** (4). 1369-1380.
- REID, S. D.; SELANDER, R. K.; WHITTAM, T. S. (1999). Sequence diversity of flagellin (*fliC*) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. *J. Bact.* **181** (1). 153-160.
- SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. (1994). Bacterial pathogenesis. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning-a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Referências Bibliográficas

- SILVEIRA, W. D.; FERREIRA, A.; HOLLANDA, L. M.; CASTRO, A. F. P.; YAMADA, A. T.; LANCELLOTTI, M. (2002). Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microb.* **85**. 47-53.
- SILVEIRA, W. D.; REIS, E. R.; ARNS, C. W.; SIRCILI, M. P.; FANTINATTI, F.; BROCCHI, M. (1998). Possible involvement of an outer membrane protein in the pathogenicity of a chicken septicemic *Escherichia coli* isolate. *Rev. Microbiol.* **29**. 113-117.
- SPERANDIO, V.; SILVEIRA, W. D.; (1993). Comparison between enterotoxigenic *Escherichia coli* strains expressing "F42", F41 and K99 colonization factors. *Microb. Immun.* **37(11)**. 869-875.
- STORDEUR, P.; MALIER, D.; BLANCO, J.; OSWALD, E.; BIET, F.; DHO-MOULIN, M.; MAINIL, J. (2002). Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. *Vet. Microb.* **84**. 231-241.
- STATHOPOULOS, C.; PROVENCE, D. L.; CURTISS III, R. (1999). Characterization of the avian pathogenic hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease type family of autotransporters. *Infect. Immun.* **67 (2)**. 772-781.
- VIDOTTO, M. C.; NAVARRO, H. R.; GAZIRI, L. C. J. (1997). Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Vet. Microb.* **59**. 70-87.

Referências Bibliográficas

- VIDOTTO, M.C.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.A.; GUIMARÃES, I.G.; SANTOS, D.D. (1990). Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **34**. 531-538.
- WANG, L.; ROTHEMUND, D.; CURD, H.; REEVES, P.R. (2000). Sequence diversity of the *Escherichia coli* H7 *fliC* genes: implication for a DNA-based typing scheme for *E. coli* O157:H7. *J. Clin. Microb.* **38(5)**. 1786-1790.
- WHITE-ZIEGLER, C.A.; VILLAPAKKAM, A.; RONAXZELI, K.; YOUNG, S. (2000). H-NS controls *pap* and *daa* fimbrial transcription in *Escherichia coli* in response to multiple environmental cues. *J. Bact.* **182 (22)**. 6391-6400.
- WOOLEY, R. E.; GIBBS, R. S.; BROWN, T. P.; GLISSON, J. R.; STEFFENS, W. L.; MAURER, J. J. (1998). Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11. *Avian dis.* **42**. 194-198.