



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA ANGELITA SAMPAIO BAPTISTA

**CLONAGEM E ANÁLISE GENÉTICA DO GENE *iss*, E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ANTICORPO IgY ANTI-
PROTEÍNA RECOMBINANTE ISS DE *Escherichia coli*
PATOGENICA PARA AVES (APEC)**

Londrina
2009

ANA ANGELITA SAMPAIO BAPTISTA

**CLONAGEM E ANÁLISE GENÉTICA DO GENE *iss*, E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ANTICORPO IgY ANTI-
PROTEÍNA RECOMBINANTE ISS DE *Escherichia coli*
PATOGENICA PARA AVES (APEC)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal (Área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Marilda C. Vidotto.

Co-orientadora: Profa. Dra. Renata K.T. Kobayashi.

Londrina
2009

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B222c Baptista, Ana Angelita Sampaio.
Clonagem e análise genética do gene *iss*, e avaliação da atividade do anticorpo IgY anti-proteína recombinante Iss de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) / Ana Angelita Sampaio Baptista. - Londrina, 2009.
64 f. : il.

Orientador: Marilda Carlos Vidotto.
Co-orientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2009.
Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli*. – Teses. 2. Colibacilose – Teses. 3. Genética animal – Teses. 4. Aves – Doenças – Teses. I. Vidotto, Marilda Carlos. II. Kobayashi, Renata Katsuko Takayama. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 579.842

ANA ANGELITA SAMPAIO BAPTISTA

**CLONAGEM E ANÁLISE GENÉTICA DO GENE *iss*, E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ANTICORPO IgY ANTI-
PROTEÍNA RECOMBINANTE ISS DE *Escherichia coli*
PATOGENICA PARA AVES (APEC)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal (Área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Luis Garcia.
Universidade Estadual de Londrina

Dr. Benito Guimarães de Brito.
Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério
Finamor

Profa. Dra. Marilda Carlos Vidotto.
Universidade Estadual de Londrina.

Londrina, 20 de fevereiro de 2009.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Protozoologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias e Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, sob orientação da Profª Drª Marilda Carlos Vidotto.

“Os recursos financeiros para o desenvolvimento desta dissertação foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa relacionados abaixo”:

- 1. CAPES – Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior.**
- 2. CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.**
- 3. PRO-PPG – Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina.**

DEDICATÓRIA

À Deus...

Fonte de inspiração, fortaleza e esperança.

*“Quando os meus olhos não podiam ver
tua mão segura me ajudou a andar
quando eu não tinha mais amor no peito
teu amor me ajudou a amar
quando os meus sonhos vi desmoronar
me trouxestes outros para recomeçar
quando me esqueci que era alguém na vida
teu amor veio me lembrar:
que Deus me ama, que não estou só
que Deus cuida de mim quando fala pela tua voz
e me diz: **coragem!**”*

(Pe Fábio de Melo)

Aos meus pais, Jorge e Tereza

Aos meus irmãos Aparecido, Ângela e Antonio.

Pelo Amor, confiança e motivação.

AGRADECIMENTOS

À Deus por cada dia ao meu lado e sobretudo pela força, esperança e coragem que destes.

Aos meus queridos pais, Jorge e Tereza, que sempre com muito amor acreditaram em mim e me incentivaram a prosseguir principalmente nos momentos difíceis.

Aos meus amados irmãos, Aparecido, Ângela e Antonio, pela doce amizade, apoio emocional e também financeiro!

Ao meu namorado, Ciro, pela paciência, amor e ajuda constantes que mesmo a distância soube ser tão presente.

À Profª Drª Marilda Vidotto, pela orientação, por todo conhecimento transmitido neste período de convivência e pelo exemplo de persistência e dedicação.

À Profª Drª Renata Kobayashi por colaborar, orientar e participar constantemente dos experimentos.

Ao Prof. Dr. João Luis Garcia pela contribuição, sugestões e principalmente pela disponibilidade e atenção que me destes durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Benito Brito, pela contribuição e sugestões dadas ao trabalho e pelo apoio prestado ao disponibilizar o Laboratório Ecolvet para a realização de um dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Emerson Venancio, colaboração, pelas correções e sugestões dadas durante os experimentos e no exame de qualificação.

Aos professores do programa de pós-graduação em ciência animal, pela disponibilidade e pelo conhecimento transmitido.

Aos professores Dr. Amauri e Drª Alice Alfieri, por disponibilizar a utilização de equipamentos do laboratório de virologia animal.

Ao Prof. Dr. João Waine por elaborar e fornecer da ração dos animais utilizados no experimento.

Aos prof. Dr. Mario Ono, Drª Sueli F. Ogatta, pela ajuda nos momentos de dúvidas e por disponibilizar seus laboratórios e equipamentos sempre que necessário.

Aos funcionários Elizabete Marana (Bete) e Aldair pela colaboração e pelas muitas horas de convívio diário.

Aos funcionários Marta, Jussevania e funcionários do departamento de radiografia do Hospital Clínico, pela enorme colaboração.

À médica veterinária Aline Ranucci, pela ajuda nas necropsias.

À minha amiga Elis pelo convívio, amizade e cumplicidade diversos momentos.

À amiga Tatiane Petrone, pelas muitas horas de trabalho juntas, por compartilhar as dúvidas, alegrias, frustrações e principalmente pelas risadas e bom humor.

Aos funcionários e colegas do laboratório de virologia, Kerley, Maria, Dalíria, Patrícia e aos demais pela amizade e pelo apoio.

Aos colegas Stelamaris, Vanessa Veronese, Vanessa Myakawa, Alexey Morgado, Kledir, Juliana Tomazi, Gabriela Oliveira e Flora Kanno pela amizade, colaboração e palavras de otimismo.

Aos colegas da protozoologia, Amanda, Daniel, Denise, Aline, Marcela e Adriana pela amizade e convívio.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que de algum modo colaboraram para a realização deste trabalho.

BAPTISTA, Ana Angelita Sampaio. **Clonagem e análise genética do gene *iss*, e avaliação da atividade do anticorpo IgY anti-proteína recombinante ISS de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC)**. 2009. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Amostras de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) são responsáveis pela colibacilose aviária, a qual é uma das principais causas de prejuízos econômicos na avicultura industrial moderna decorrente do aumento da mortalidade, custos com tratamento e condenação de carcaças no abatedouro. A patogenicidade das amostras de APEC está relacionada à presença de um ou mais fatores de virulência, sendo um dos principais fatores, a proteína Iss, codificada pelo gene *iss* (*increased serum survive*). Esta proteína confere ao microorganismo resistência ao sistema complemento, aumentando sua capacidade em sobreviver no soro. Os objetivos deste trabalho foram clonar e seqüenciar o gene *iss* e caracterizar a proteína Iss recombinante de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC). O gene *iss* da amostra APEC9 foi clonado no vetor pET SUMO e sub-clonado no vetor pET30. Este gene, após o sequenciamento, foi classificado como *iss* tipo 1, pela diferenciação dos três tipos de alelos do gene *iss*. A proteína Iss-SUMO apresentou 22 kDa, sendo 11kDa da proteína de fusão SUMO e 11 kDa da Iss, expressa em BL21 (DE3) e purificada por coluna de afinidade ao níquel. A massa molecular da Iss recombinante (rISS), quando o gene foi sub-clonado no vetor pET30, apresentou 14 kDa. Esta proteína foi utilizada para a imunização de galinhas poedeiras, as quais apresentaram resposta imune humoral pelo teste de ELISA. Os anticorpos IgY anti-rIss, purificados dos ovos das galinhas imunizadas, reagiram com rIss por Western blot e foram utilizados nos testes de inibição de resistência sérica e teste de imunoproteção de pintainhos. Os resultados demonstraram a inibição do crescimento bacteriano na presença de complemento e a diminuição do escore de lesão por aerossaculite nos pintainhos. Os resultados obtidos ampliam perspectivas de novas investigações a respeito da proteína Iss.

Palavras-chave: *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC). Gene *iss*. Clonagem. Expressão de proteína recombinante. rISS.

BAPTISTA, Ana Angelita Sampaio. **Cloning and genetic analysis of the *iss* gene and evaluation of activity of the antibody IgY ISS recombinant anti-protein from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)**. 2009. 67p. Dissertation (Master of Science Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Escherichia coli strains designated as avian pathogenic *E. coli* (APEC) are responsible to avian colibacillosis, which is the principal cause of high economic losses in the modern poultry industry, due the increase of mortality, medication cost and condemnation of carcasses. The APEC pathogenicity is related to presence of several virulence factors, being the Iss (*Increased survives Serum*) protein a principal responsible characteristic of resistance to complement system, increasing its capacity to survive in the serum. The objectives of this work were both study the diversity sequence *iss* gene from APEC and characterize the recombinant Iss protein by its biological activity. The *iss* gene from APEC 9 strain of 309 pb was cloned in the pET SUMO vector and sub-cloned in the pET 30. The *iss* gene was classified as *iss* type 1 by differentiation of the three *iss* gene allele types. The recombinant protein (rIss) was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) by induction of IPTG and purified in resin charged with the nickel ion. The molecular mass of rIss-SUMO was 22 kDa, corresponding 11 kDa of Iss protein and 11 kDa SUMO protein and the rIss from pET30 was 14 kDa. The rIss was used to immunize hens and the results showed induction of immune response. Antibodies IgY anti rIss, purified from eggs of immunized hens, reacted by Western blotting with rIss showing specific molecular mass and they were utilized in the serum resistance inhibition tests and . The results demonstrated inhibition the bacterial grown in the serum and decrease of lesions score in the chicken one day old. In conclusion, the *iss* gene from APEC 9 strain is the genotype 1 that is highly prevalent among APEC and it could be used in diagnostic protocols, and these data increase the perspectives of new investigation about Iss protein.

Keywords: Avian pathogenic *E. coli* (APEC). Gene *iss*. Serum resistance. Cloning. rIss.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Cloning, sequencing, expression and sequence diversity of iss gene from avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated in Brazil

- Figure 1** –Agarose gel with pETSUMO/*iss*. 1-pETSUMO/*iss*; 2-pETSUMO/*iss* clived with EcoRI; 3-lambda HindIII..... 38
- Figure 2** –Alingment of *iss* Londrina strain and *iss* type 1, 2, 3, and *bor* genes sequences. Gray shading indicates those nucleotides that are different from Londrina and type 1 sequences..... 38
- Figure 3** –Expression of the rIss protein by clone *E. coli*/pETSUMO-*iss* and immunological response of this protein in chickens. (A) SDS-PAGE 15% stained with Comassie brilhant blue. Lane 1- *E. coli* BL21; lane 2 - clone BL21/pETSUMO-*iss* non induced; lane 3 - clone BL21/pETSUMO-*iss* induced with IPTG 1mM; lane 4 - eluted rIss; lane 5 - Mass Molecular. The band of approximately 22 kDa corresponding to Iss protein. (B) Western blot with anti-rIss IgY and anti-chicken IgG conjugated with peroxidase. Lane 1 - *E. coli* BL21; lane 2 - clone BL21/pETSUMO-*iss* induced with IPTG 1mM; lane 3 - eluted rIss; The band of approximately 22 kDa corresponding to recombinant Iss protein 39

Avaliação da atividade biológica do anticorpo IgY anti-proteína recombinante Iss de Escherichia coli patogênica para aves (APEC)

- Figura 1** –Clivagem pET30/*iss* com as enzimas de restrição Hind III e SmaI. 1- marcador molecular; 2-pET30/*iss* sem clivar; 3- pET30/*iss* clivado com Hind III; 4- pET30/*iss* clivado com SmaI 57
- Figura 2** –Expressão e resposta imunológica da proteína rIss em galinhas poedeiras. (A) SDS-PAGE 15% corado com com Comassie brilhant blue. (B) Western blotting com IgY anti-rIss e anti-*chicken* IgG conjugado com peroxidase. Linha 1.BL21/pET30-*iss* induzida com IPTG 1mM; linha 2- rISS eluída; linha 3 - *E. coli* BL21; linha 4- Massa molecular. A banda de aproximadamente 14kDa corresponde a proteína Iss recombinante 57

Figura 3 – Teste de ELISA demonstrando o aumento dos níveis de IgY anti-rISS, após as imunizações das aves com a proteína recombinante ISS.....	58
Figura 4 – Curva do ensaio de resistência sérica e inibição da atividade sérica das amostras bacterianas APEC9 e BL21, incubadas com soro de galinha e IgY anti-rISS a 37°C.....	58

LISTA DE TABELAS

Avaliação da atividade biológica do anticorpo IgY anti-proteína recombinante Iss de Escherichia coli patogênica para aves (APEC)

Tabela 1 – Tratamentos realizados no experimento de inibição da atividade sérica na presença de IgY anti-rIss	46
Tabela 2 –Graus de aerossaculite após infecção pela amostra APEC9 <i>Escherichia coli</i> patogênica para aves (2×10^6 CFU/ml)	47
Tabela 3 –Análise estatística (ANOVA não paramétrico), do escore de lesão por aerossaculite, verificados no ensaio de imunoproteção de pintainhos	49

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATOGENICA PARA AVES (APEC)	15
1.3 GENE <i>ISS</i> E PROTEÍNA <i>ISS</i>	17
REFERÊNCIAS	20
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	26
3.1 “CLONING, SEQUENCING, EXPRESSION AND SEQUENCE DIVERSITY OF <i>ISS</i> GENE FROM AVIAN PATHOGENIC <i>ESCHERICHIA COLI</i> (APEC) ISOLATED IN BRAZIL”	26
ABSTRACT	26
INTRODUCTION	27
MATERIALS AND METHODS	28
Bacterial strain	28
Cloning and sequence analysis of the <i>iss</i> gene	28
Expression of genes on <i>E. coli</i> strain and purification of recombinants <i>Iss</i> proteins	29
Production of IgY and hyperimmune serum in hens	30
SDS PAGE and Western blotting	30
RESULTS	31
DISCUSSION	32
REFERENCES	34
3.2 “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ANTICORPO IG γ ANTI-PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>ISS</i> DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATOGENICA PARA AVES (APEC)”	40
RESUMO	40
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS	43
Amostra bacteriana	43
Clonagem do gene <i>iss</i> e expressão da proteína recombinante	43
Purificação da proteína recombinante	44

Imunização de galinhas poedeiras e extração da imunoglobulina da classe Y (IgY).....	44
Teste de ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay).....	45
Detecção de anticorpos anti-rIss pela técnica de Western blot.....	45
Teste de resistência sérica e de inibição da atividade sérica	46
Teste de imunoproteção passiva de pintinhos de um dia com IgY/rIss.....	47
Análise Estatística	48
RESULTADOS	48
Clonagem, expressão e caracterização da proteína Iss recombinante	48
Produção de anticorpos (IgY) anti- rIss	48
Teste de resistência sérica e inibição da atividade sérica	49
Teste de imunoproteção em pintainhos de um dia com IgY anti-rIss	49
DISCUSSÃO	50
REFERÊNCIAS	53
4 CONCLUSÕES	59
APÊNDICE	60
APÊNDICE A – Soluções e Tampões.....	61
APÊNDICE B – Protocolo de Técnicas	64

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é atualmente o líder no ranking mundial de exportadores de carne de frango e assume o terceiro lugar em produção (UBA, 2009). O setor avícola contribui com 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) do país (TURRA, 2008), sendo o setor melhor sucedido do agronegócio nacional, isto permite avanços na economia com geração de emprego e divisas, movimentando bilhões de reais por ano (GONÇALVES, 2005).

O sucesso e a competitividade do setor avícola brasileiro no mercado mundial devem-se a uma associação de fatores, que vão desde características geográficas, clima, disponibilidade de matéria prima, custo de produção e principalmente o status sanitário (CARON, 2008), visto que o controle e a prevenção sanitária são requisitos fundamentais para garantir à avicultura brasileira competitividade no mercado internacional (QUEVEDO, 2007).

Diante da expansão do mercado mundial de carne de aves, e ao aumento das exportações brasileiras, as questões sanitárias preocupam e são pontos decisivos para a manutenção do atual status de exportação e para a conquista de novos mercados. Neste contexto o desenvolvimento e a promoção de condições sanitárias de prevenção e combate a patologias aviárias assume um papel relevante.

A intensificação da produção contribui para a produtividade e eficiência da indústria avícola, contudo, conseqüentemente aumenta o risco de disseminação das doenças infecciosas e da necessidade de um maior controle da qualidade dos produtos. Dentre as doenças importantes em avicultura destacam-se, especialmente, as que afetam o sistema respiratório das aves, por causarem um impacto sobre o custo de produção de frangos (GONÇALVES, 2005).

Escherichia coli é um dos principais agentes oportunistas e agressores do trato respiratório das aves, e também está relacionado a outras infecções decorrentes de septicemias, gerando um sério prejuízo econômico para o setor avícola. No Brasil, entre os anos de e 2001 a 2005, a condenação total ou parcial de carcaças pela presença de lesões associada a *E. coli*, como agente responsável, proporcionou perdas estimadas de 58 milhões de dólares (ROCHA et al., 2008).

A utilização de vacinas é uma estratégia que permite minimizar o risco de doenças nos plantéis. Atualmente, com o avanço da biologia molecular e imunologia, novas estratégias estão sendo aplicadas para o desenvolvimento de vacinas eficientes e seguras. São diversas as possibilidades que tecnologia do DNA recombinante oferece, no que tange a aplicabilidade das técnicas para o desenvolvimento de métodos para diagnóstico e vacinas.

1.2 *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA PARA AVES (APEC)

Escherichia coli é um bacilo Gram negativo, anaeróbico facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (MOKADY et al., 2005), não esporulado, cujo tamanho varia de 1,1 a 1,5mm por 2-6 mm, a maioria das amostras é móvel, devido à presença de flagelos peritríquios (BARNES; GROSS, 1997, FERREIRA; KNÖBL, 2000).

As linhagens de *E. coli* patogênicas encontradas em aves, denominadas “*Avian Pathogenic E. coli*” (APEC) estão associadas com infecções extraintestinais, principalmente do trato respiratório ou infecções sistêmicas, (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). As infecções no trato respiratório geralmente são secundárias a outras infecções: bacterianas (*Mycoplasma gallisepticum*) ou virais (vírus da Doença de Newcastle e vírus da Bronquite Infecciosa) (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; LA RAGIONE; WOODWARD, 2002).

As infecções causadas por APEC são designadas colibacilose aviária, a qual é uma das principais doenças de impacto na avicultura industrial moderna, devido aos grandes prejuízos econômicos causados por quadros como: colisepticemia, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, aerossaculite, pericardite, celulite, coligranuloma, doença crônica respiratória complicada (DRCC), onfalite, salpingite, síndrome da cabeça inchada (SCI), panoftalmia, osteomielite, ooforite e sinovite (FERREIRA; KNÖBL, 2000; GROSS, 1994; LA RAGIONE WOODWARD, 2002).

Os prejuízos econômicos decorrentes desta enfermidade vão desde aspectos relacionados ao comprometimento do crescimento, da conversão alimentar e da uniformidade dos lotes (MINHARRO et al., 2001; ASSIS et al., 2003) assim como custos com tratamento, mortalidade de animais e condenação de carcaças no abatedouro (BARNES; GROSS, 1997).

O comprometimento do ganho de peso das aves pode ocasionar uma série de falhas tecnológicas durante o abate, como cortes no trato digestivo, já que os equipamentos

na linha de abate não se ajustam ao tamanho menor das carcaças. Este erro tecnológico leva a um aumento no percentual de contaminação fecal das carcaças e, portanto, há um maior risco de contaminação bacteriana das mesmas (RUSSEL, 2003).

Estudos sugerem que por existir similaridade entre os fatores de virulência de APEC e outras *E. coli* extraintestinais (ExPEC), isto possa contribuir para o risco zoonótico da colibacilose (RON, 2006; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007).

As amostras de APEC pertencem predominantemente a três sorogrupos O1, O2 e O78 em diferentes países (CLOUD et al., 1985; MELATTA et al., 2003; YAGUCHI et al., 2007; McPEAKE et al., 2005). Entretanto, diferentes sorogrupos foram evidenciados: O8, O15, O45, O53, O55, O86 e O111 (HEMSLEY et al., 1967), O1, O2, O8, O18, O53, O78, O88, O109, O140, O2, O50, O79, O152, O33, O78, O45, O119, O145 (BARBOUR et al., 1985), O1, O2, O11, O35, O45, O55, O78 (DOZOIS et al., 1992), O2, O45, O78 (VALVANO, 1992) O18, O22 (DOZOIS et al., 1994) O12, O14, O24, O40, O70, O79, O80, O81, O89, O91, O92, O108, O116, O123, O124, O128, O157, O159, O160 e O166 (BLANCO et al., 1998). No Brasil os sorogrupos prevalentes são O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119 e O152 (FERREIRA; KNÖBL, 2000; MENÃO et al., 2002) e O5, O45, O120, O140, O150, O166 (MOURA et al., 2001).

Apesar de diversos trabalhos demonstrarem os sorogrupos prevalentes em amostras de APEC, a caracterização destas, não pode ser associada apenas a esta informação, visto que é possível encontrar amostras apatogênicas pertencentes aos diferentes sorogrupos O. Além disso, muitas amostras patogênicas não são tipáveis (MOURA et al., 2001; MENÃO et al., 2002; McPEAKE et al., 2005; YAGUCHI et al., 2007), e quando se investiga a associação de sorogrupos a fatores de virulência percebe-se que determinados genes relacionados a patogenicidade como: *iss*, *tsh*, *cvaC*, *iutA* são amplamente distribuídos entre APEC, independente do sorogrupo O (YAGUCHI et al., 2007; McPEAKE et al., 2005). Desse modo, a investigação da presença e prevalência de fatores de virulência torna-se necessária, para que se possa ter um marcador característico de amostras de APEC.

Estudos têm demonstrado significativa diferença na presença de fatores e genes de virulência em amostras de *E. coli* patogênicas e comensais. Atribuindo uma forte associação entre APEC e fatores/genes de virulência, o que sugere um importante papel destes na patogenicidade das amostras (YAGUCHI et al., 2007).

Os principais fatores e genes de virulência descritos em APEC são Fimbria tipo 1 (F1A) e fimbria P (F11), curli, aerobactina, antígeno capsular (K1), hemaglutinina temperatura sensível (TSH), (MELLATA et al., 2003) resistência ao soro (proteínas de

membrana externa: Iss, TraT, Omp A) e toxinas, produção de colicinas, e hemolisinas (LARRAGIONE; WOODWARD, 2002; VIDOTTO et al., 1990; NOLAN et al., 2003). Genes associados à APEC, dentre os quais estão presente “*increased serum survive*” (*iss*), hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*) e colicina V (*cvaC*), tem sido estudados na tentativa de encontrar uma correlação destes com a patogenicidade das amostras (DELICATO et al., 2002; SKYBERG et al., 2003).

O controle da colibacilose tem sido dificultado ao longo dos anos em virtude do aumento da frequência de resistência a antibióticos (VANDEMAELE et al., 2002; McPEAKE et al., 2005) e por carência de um marcador que identifique facilmente amostras de *E. coli* virulentas. Dessa maneira estudos voltados para o conhecimento dos fatores de virulência podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para o controle da colibacilose (NOLAN et al., 2003), principalmente, no que se refere a capacidade em resistir aos componentes do soro, já que, relatos atribuem a este fator de virulência, uma participação significativa na patogênese da colibacilose aviária (MELLATA et al., 2003).

1.3 GENE *ISS* E PROTEÍNA *ISS*

O gene *iss* (*increased serum survive*) foi descrito pela primeira vez por Binns et al. (1979), por seu papel na resistência ao soro associado com o plasmídeo que codifica a produção de colicina (Col V) em isolados de *E. coli* humana, aumentando em 100 vezes a virulência de *E. coli* para pintainhos de um dia de idade (BINNS et al., 1979).

O gene *iss* foi localizado na ilha de patogenicidade presente no plasmídeo ColIV/BM, que comumente ocorre em amostras de APEC, localizado em uma região altamente conservada do plasmídeo (JOHNSON et al., 2006).

Johnson et al. (2002) descreveram que em APEC, o gene *iss* localiza-se em um plasmídeo conjugativo R, com um tamanho aproximado de 100 kilobases, juntamente com outros genes de virulência e de resistência a antimicrobianos. A transferência deste plasmídeo, por conjugação, para outras bactérias avirulentas, inclusive outras *E. coli*, pode conferir a estas a capacidade de produzir colicina, aerobactina, resistência à ampicilina, à tetraciclina e ao complemento. (JOHNSON et al., 2002).

Acredita-se que *iss* seja derivado do gene *bor*, um gene do bacteriófago lambda, que codifica a lipoproteína Bor, presente no envelope celular do lisógeno conferindo resistência sérica a este (HORNE et al., 2000).

A seqüência de nucleotídeos destes dois genes apresenta 90% de similaridade (HORNE et al., 2000). Porém o gene *bor*, esta presente também em amostras de *E. coli* comensal (LYNNE et al., 2006a; LYNNE et al., 2007; PFAFF-MCDONOUGH et al., 2000) enquanto que *iss* é mais freqüente em amostras patogênicas (PFAFF-MCDONOUGH et al., 2000).

Johnson et al (2008), ao realizar estudos sobre a evolução do gene *iss*, avaliando alinhamento de seqüências de *iss* e *bor*, demonstraram que existem três alelos geneticamente distintos de *iss*, os quais foram classificados como tipo 1, 2 e 3. A similaridade da seqüência da *iss* tipo 1 em relação as demais é de 94,2 e 95,5%. A *iss* tipo 1 é encontrada geralmente em plasmídios e sua ocorrência é maior entre as APEC e *E. coli* isoladas de meningite (66% e 78% respectivamente), sugerindo uma alta prevalência do plasmídio ColV/BM entre estas bactérias.

Estudos realizados por Pfaff-McDonough et al. (2000), sugerem que a presença apenas do gene *iss* não seria suficiente para identificar uma cepa como virulenta, já que foi demonstrada a presença deste gene em amostras comensais. Todavia, Tivendalle et al. (2004) afirmam que o gene *iss* desenvolve um importante papel na virulência de APEC, e quando associado ao gene *iucA*, que codifica para a produção do sideróforo aerobactina, permite-se verificar amostras altamente virulentas.

A ocorrência de *iss* está associada a colisepticemia e celulite aviária (JEFFREY et al., 2002). Brito et al. (2003) demonstraram uma alta prevalência (83%) do gene *iss* em amostras de *E. coli* isoladas de casos de celulite, sugerindo um possível papel do gene *iss* na patogenia desta enfermidade.

A proteína Iss, codificada pelo gene *iss*, é uma lipoproteína de 10-11 kDa localizada na membrana externa bacteriana, contém 102 aminoácidos e é resistente à hidrólise ácida (HORNE et al., 2000; NOLAN et al., 2003). Esta proteína é responsável pelo bloqueio do complexo terminal do sistema complemento que atua na membrana celular causando a lise bacteriana (BINNS et al., 1982).

A habilidade em restringir o depósito da proteína C3 do sistema complemento sobre a superfície bacteriana confere ao microorganismo a capacidade de sobreviver na presença de soro (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999), driblando o sistema complemento, o qual é o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas, já que promove a opsonização ou mesmo lise do agente infeccioso (BINNS et al., 1982).

O sistema complemento é o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001). A capacidade em resistir aos efeitos protetores do sistema complemento do hospedeiro, que algumas amostras bacterianas de *E. coli* apresentam, exerce um importante papel no desenvolvimento de colibacilose nas aves (NOLAN et al., 2003), visto que bactérias sensíveis ao soro são incapazes de colonizar órgãos internos (MELLATA et al., 2003).

Os mecanismos de resistência ao complemento em *E. coli*, têm sido relacionados à presença do antígeno capsular K-1, a lipopolissacarídeos (LPS) e a determinadas proteínas de membrana externa tais como: Iss, TraT e OmpA (NOLAN et al., 2003). Porém, a presença de cápsula ocorre raramente em amostras de APEC e isto permite a dissociação deste fator com resistência ao complemento (PFAFF-MCDONOUGH et al., 2000). Quanto à presença de LPS, tanto amostras de *E. coli* isoladas de aves com colibacilose, quanto isolados de fezes de aves saudáveis apresentaram esta estrutura, já que se trata de uma bactéria Gram-negativa, desse modo esta característica não permite que seja feita correlação com a capacidade da amostra em causar doença (PFAFF-MCDONOUGH et al., 2000).

Estudo avaliando a relação dos genes *iss*, *traT*, *ompA* com a resistência ao complemento, demonstrou que não houve diferença significativa quanto a presença de TraT e OmpA no que se refere a patogenicidade das amostras, enquanto que houve diferença altamente significativa quanto a presença de Iss (PFAFF-MCDONOUGH et al., 2000).

De acordo com Mellata et al. (2003), dentre os mecanismos de virulência encontrados em APEC, a resistência ao efeito bactericida do soro, mediada pelo gene *iss*, apresenta-se como um relevante mecanismo, apesar de não ser o único presente em bactérias capazes de atingir aos os órgãos internos das aves e causar uma infecção. Nolan et al. (2003) sugerem que o gene *iss* assume papel fundamental no mecanismo de resistência ao sistema complemento do hospedeiro.

O gene *iss*, já foi encontrado em diversos sorogrupos de APEC, e isolado de vários tipos de lesões, de diferentes espécies de aves e formas de colibacilose (LYNNE et al. 2006a), e, além disso, análise da seqüência de aminoácidos sugere muitas porções de Iss como antigênicas (HORNE et al., 2000; LYNNE et al., 2006a; 2006b; LYNNE et al., 2007), dessa maneira, estratégias centradas no gene *iss* poderiam contribuir para o controle da colibacilose, já que a proteína Iss apresenta-se como bom imunógeno e poderia ser utilizada como vacina (LYNNE et al., 2006a). Porém existe a necessidade de estudos para se determinar e definir melhor a contribuição do gene *iss* na patogênese da colibacilose aviária, além de explorar a eficácia da proteína Iss como uma vacina e em protocolos de diagnóstico.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, M.T.Q.M.; GRUBER, G.L.; HOFMEISTER, A.W.; GUIMARÃES, A.M.P. Avaliação do percentual de descarte na condenação parcial de frangos. **Revista Nacional da Carne**, n.313, p.22-31, 2003.
- BARBOUR, E. K.; NABUT, N.H. e AL-NAKHLI, H.M.. Use of epidemiologic markers to identify the source of *Escherichia coli* infections in poultry. **Am J. Vet. Res.** v.46, n.4, p. 989-991, 1985.
- BARNES, J.H. e GROSS, W.B. Colibacillosis. In: CALNEK, B.W. **Diseases of poultry**. 10th ed. Ames, p.131-139. 1997
- BINNS, M.M.; DAVIES, D.L.; HARDY, K.G. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. **Nature**, v. 279, p.778-781, 1979.
- BINNS, M.M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R.P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes traT of R100 and *iss* of ColV, I-K94. **Infection and Immunity**, n.2, v.35, p.654-659, 1982.
- BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; MORA, A.; JANSEN, W.H.; GARCÍA, V.; VÁSQUEZ, M.L. and BLANCO, J. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (Northwest Spain). **Veterinary Microbiology**, v.61, p.229-235, 1998.
- BRITO, B.G.; GAZIRI, J.; VIDOTTO M.C. Clonal relationships among strains and virulence factors of avian *Escherichia coli* from cellulitis aviária. **Infection and Immunity**, v.71, p.4175-4177, 2003.
- CARON, L. F., Capacidade de resposta imunológica nas aves , estratégia de monitoramento. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 9, 2008, Chapecó, SC, **Anais do IX Simpósio Brasil Sul de Avicultura, 01, 02, 03 de abril de 2008**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, p. 84 – 86.
- CLOUD, S.S.; ROSENBERGER, J.K.; FRIES, P.A.; WILSON, R.A. and ODOR, E.M. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity. **Avian Diseases**, v.29, p.1084-1093, 1985
- DELICATO, E.R.; BRITO, B. G.; KONOPATZKI, A.P.; GAZIRI, L.C. J. AND VIDOTTO, M.C. Occurrence of the Temperature-Sensitive Hemagglutinin Among Avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**: v.46, n.3, p.713–716, 2002

DHO-MOULIN, M. e FAIRBROTHER, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* APEC. **Veterinary Research**, v.30, p.299-313, 1999.

DOZOIS, C.M., N. CHANTELOUP, M. DHO-MOULIN, A. BRÉE, C. DESAUTELS, AND J.M. FAIRBROTHER. Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickes experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.38, p. 231-239, 1994.

FERREIRA, A.J.P; KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. IN: BERCHIERE JR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 197-205.

FOLEY, S.L.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; ROBINSON, M.; NOLAN, L.K. Iss from a virulent *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 44, p. 185-191, 2000.

GONÇALVES, P.M.R. *Escherichia coli* com detecção do gene *iss* por PCR, micoplasmas e salmonelas na qualidade sanitária de frangos de corte ao abate. **2005. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói.**

GROSS, W.B. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry, In: Gyles C. L. ***E. coli* in domestic animals and man**. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p.237-259.

HEMSLEY, R.V.; BARNUM, D.A. e INGRAM, D.G. Biochemical and serological studies of avian strains of *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.11, p.90-97, 1967.

HORNE, S.M.; MCDONOUGH, J.P.; GIDDINGS, C.W.; NOLAN, L.K. Cloning and sequencing of *iss* gene from virulent avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.44, p. 179-184, 2000.

ITURRY-YAMAMOTO, G.R.e PORTINHO,C.P. Sistema Complemento: Ativação, Regulação e Deficiências Congênitas e Adquiridas.. **Rev Ass Med Brasil**, v.1, n.47, p.41-51, 2001.

JEFFREY, J.S., NOLAN, L.K., TONOIBA, K.H., WOLFE, S., GIDDINGS, C.W. HORNE, S.M. et al. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colissepticemia lesions in chickens. **Avian Diseases**, n.46, p.48-52, 2002.

JOHNSON, T.J.; JOHNSON, S.J.; NOLAN, L.K., Complete DNA Sequence of a ColBM Plasmid from Avian Pathogenic *Escherichia coli* Suggests that It Evolved from Closely Related ColV Virulence Plasmids. **Journal of Bacteriology**. n.16, v.188, p.5975–5983, 2006.

JOHNSON, T. J., WANNEMUEHLER, Y. M., NOLAN, L.K. Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli*, **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.8, p.2360–2369, 2008.

JOHNSON, T.J.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; SKYBERG, J.; OLAH, P.; KERCHER, R.; SHERWOOD, J.S.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L.K. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**, v.6, p.342-352, 2002.

LA RAGIONE, R. M ; WOODWARD, M. J.; Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia- article review. **Research in Veterinary Science**, n.73, p.27–35, 2002.

LYNNE, A.M.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L.K. Immune response to recombinant *Escherichia coli* Iss protein in poultry. **Avian Diseases**, v. 50, p.273-276, 2006a.

LYNNE, A.M.; FOLEY,S.L.; NOLAN, L.K. Characterization of monoclonal antibodies to avian *Escherichia coli* Iss. **Avian Diseases**, v.50, p.445-449, 2006b.

LYNNE, A.M.; SKYBERG, J.A.; LOGUE, C.M.; NOLAN, L.K. Detection of Iss and Bor on the surface of *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.660-666, 2007.

McPEAKE, S.J.W., SMYTH, J.A., BALL, H.J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. **Veterinary Microbiology**. n.110, p. 245-253, 2005.

MELLATA, M.;DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C.M.; CURTISS, R.; BROWN, P.K.; ARNÉ, P.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; FAIRBROTHER, J.M. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* strains to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunology**, v.71, p.536-540, 2003.

MENÃO, M.C.; FERREIRA, C.S.A, CASTRO, A.G.M.; KNÖBI, T.; FERREIRA, A.J.P. Sorogrupos e *Escherichia coli* isolados de frangos com doença respiratória crônica. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, n.4, p.15-17, 2002.

MINHARRO, S.; LINHARES, G.F.C.; ANDRADE, M.A.; ROCHA, P.T.; SANTANA, A.P. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v.2, n.2, p.111-117, 2001.

MOURA, A.C.; IRINO, K. E VIDOTTO, M.C. Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v.45, p.173-181, 2001.

MOKADY, D.; GODHNA, U.; RON, E.Z. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. **Journal Clinical Microbiology**, v.43, p.66-73, 2005.

MOULIN-SCHOULEUR, M., RE'PE'RANT, M., LAURENT, S., BRE'E, A., MIGNON-GRASTEAU, S., GERMON, P., RASSCHAERT, D. e SCHOULER, C. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains of Avian and Human Origin: Link between Phylogenetic Relationships and Common Virulence Patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.10, p.3366–3376, 2007

NOLAN, L; HORNE, S.M., GIDDINGS, C.W., FOLEY, S.L.; JOHNSON, T.J., LYNNE, A.M. Resistance to serum complement, iss, and virulence of Avian *Escherichia coli*, Review article, **Veterinary Research Communications**, v.27, p.101-110, 2003.

PFIAFF-MCDONOUGH, S.J.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; EBERT, J.O.; DOEKOTT, C.; SMITH, M.H.; NOLAN, L.K. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds with colibacillosis. **Avian Diseases**, v.44, p.23-33, 2000.

QUEVEDO, A. Anuário 2005 – Frango à brasileira. Disponível em:<
http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=12036etipo_tabela=negociosecategoria=mercado_interno-> Acesso em: 20 abr. 2007.

ROCHA, A.C.G.P., ROCHA, S.L.S., LIMA-ROSA, C.A.V., SOUZA, G.F., MORAES, H.L.S., SALLE, F.O., MORAES, L.B. e SALLE, C.T.P. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.3, p.183-186, 2008.

RON, E.Z. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, n.9, p.28-32, 2006.

RUSSEL, S.M. The effect of airsacculitis on bird weights, uniformity, fecal contamination, processing errors, and populations of *Campylobacter* spp. and *Escherichia coli*. **Poultry Science**, v. 82, p. 1326-1331, 2003.

SKYBERG, J. A.; HORNE, S.M. ; GIDDINGS, C.W. ; WOOLEY, R.E.; GIBBS, P.S. E NOLAN, L.K. Characterizing Avian *Escherichia coli* Isolates with Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Avian Diseases**, v. 47, n. 4, p.1441–1447, 2003.

TIVENDALE, K.A., ALLEN, J.L., GINNS, C. A., CRABB, B.S. E BROWNING G. F. Association of *iss* and *iucA*, but Not *tsh*, with Plasmid-Mediated Virulence of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 72, n.11, p.6554–6560, 2004.

TURRA, F. PRONUNCIAMENTO DE FRANCISCO TURRA EM SUA POSSE NA PRESIDÊNCIA DA ABEF, 2008. Disponível em: <<http://www.turra.com.br/artigos.php?id=78&pagina=2>>. Acesso: 20 nov. 2008.

UBA, UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. Disponível em: <<http://www.uba.org.br>>. Acesso 20 de jan. 2009.

VALVANO, M.A. Pathogenicity and molecular genetics of O-specific side-chain lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. **Can. J. Microbiol.**, v.38, p.11-719, 1992.

VANDEMAELE, F., VEREECKEN, M., DERIJCKE, J., GODDEERIS, B.M., Incidence and antibiotic resistance of pathogenic *Escherichia coli* among poultry in Belgium. **Veterinary Research**, v.12, n.151, p. 355–356. 2002.

VIDOTTO, M.C.; MÜLLER, E.E.; de FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.A.; GUIMARÃES, I.G. AND SANTOS, D.S. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.34, p.531-538, 1990.

YAGUCHI, K., OGITANI, A.C.T, OSAWA, A R., KAWANO, B.M., KOKUMA, B. N. I, KANESHIGE, A.T., NORO, A T., MASUBUCHI, A.K., e SHIMIZU, Y. Virulence Factors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Chickens with Colisepticemia in Japan. **Avian Diseases**, n. 51, p.656–662, 2007.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Clonar e sequenciar o gene *iss* de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) e caracterizar a proteína recombinante Iss.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar genotipicamente o gene *iss*.
- Purificar a proteína Iss recombinante (rISS), a partir de plasmídios recombinantes por meio de cromatografia de afinidade.
- Obter anticorpos específicos da classe IgY anti-rISS de galinhas poedeiras imunizadas com a proteína recombinante.
- Analisar a atividade de IgY anti-rISS na inibição do crescimento bacteriano e imunoproteção passiva de pintainhos.

3. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1. “Cloning, sequencing, expression and sequence diversity of *iss* gene from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated in Brazil”.

BAPTISTA, A.A.S.¹; KOBAYASHI, R.K.K.²; VENÂNCIO, E. J.³; VIDOTTO, M.C.¹

¹Depto. Medicina Veterinária Preventiva/CCA/UEL. ²Depto. de Microbiologia/CCB/UEL.

³Depto. De Ciências Patológicas/CCB/UEL, Campus Universitário.

Caixa Postal 6001, CEP: 86051-970, Londrina, PR. E-mail: angelita_sampaio@yahoo.com.br

Abstract

The *Iss* (*Increased Survive Serum*) protein is the major characteristic of resistance to complement system of *Escherichia coli* patogénica para aves (APEC). The objectives of this work were both study the diversity sequence *iss* gene from APEC and characterize the recombinant ISS protein by its biological activity. The *iss* gene of 309 pb was amplified by PCR, cloned and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) using the pET SUMO vector. The *iss* gene from APEC9 strain was classified as *iss* type 1 by differentiation of the three *iss* gene allele types. The protein was expressed by induction of IPTG and purified in resin charged with the nickel ion. Antibodies IgY anti rISS reacted with rISS showing a molecular mass of 22 kDa, corresponding 11KDa of ISS protein and 11 KDa SUMO protein.

Keywords: Avian pathogenic *E. coli* (APEC). Gene *iss*. Serum resistance. Cloning. rISS.

Introduction

Escherichia coli strains designated as avian pathogenic *E. coli* (APEC) possess specific virulence factors and are able to cause avian colibacillosis (VIDOTTO et al., 1990; DHO-MOULIN and FAIRBROTHER, 1999). This disease is a serious problem for the poultry industry, since it causes high economic losses. The most severe manifestation of avian colibacillosis is septicemia, which is characterized by airsacculitis, pericarditis, perihepatitis, and salpingitis (GROSS, 1994).

Several potential virulence genes were identified in APEC, and their virulence-associated bacterial properties include adherence to the respiratory tract, resistance to the immunological defences, multiplication under iron-restricted conditions, and production of cytotoxic effects (DELICATO et al., 2003; DHO-MOULIN and FAIRBROTHER, 1999; VANDEKERCHOVE et al., 2005). The genes more frequently found in pathogenic isolates and not detected in faecal isolates from healthy birds are *tsh*, *iutA*, *iss*, *cvaC*, *papC*, which were found in different associations among several putative pathotypes (DELICATO et al., 2003; LA RAGIONE and WOODWARD, 2002; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a, 2005b).

Recently we cloned and characterized the *tsh* and *iutA* genes from APEC. The anti-Tsh inhibited the hemagglutinating activity of strains APEC13 and BL21/pET101-*tsh*. Anti-IutA IgY was able to inhibit the IutA biological activity, inhibiting the sensitivity to cloacin DF13 of APEC9 (SIMÕES et al., 2006; TOCANO et al., 2008). However, anti-IutA IgY did not inhibit the growth of APEC9 in M9 and did not protect chickens inoculated with APEC, suggesting that APEC possess another iron acquisition mechanism distinct of aerobactin (TOKANO et al., 2008).

Published research has shown that the increased serum survival gene (*iss*) is strongly correlated with an APEC isolate's ability to cause disease in poultry (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005; LYNNE et al., 2007) and has been localized to large plasmids that typify the APEC pathotype (GIDDINGS et al., 2002; JOHNSON et al., 2006). Serum resistance in *E. coli* has been related to several structural factors including a K1 antigenic capsule (LEYING et al., 1990) and certain outer membrane proteins, including TraT, Iss, and OmpA (BINNS et al., 1982; CHUBA et al., 1986; WEISER and GOTSCHLICH, 1991).

The protein ISS product of *iss*, is thought to occur as a 10 to 11 kD lipoprotein in the bacterial outer membrane (HORNE et al., 2000) and presents 90% similarity with

the Bor protein, a lipoprotein of the cell envelope of *E. coli* lambda lysogens (LYNNE et al., 2007).

Recently, an alignment of all of *iss* and *bor* sequences revealed three genetically distinct alleles of *iss*, which have been designated *iss* types 1 to 3 and can discriminate the *E. coli* pathotypes (JOHNSON et al., 2008).

The objective of this study was cloning, sequencing and expression of the *iss* gene from APEC isolated in Brazil, and the phylogenetic analysis of different *iss* types.

Materials and Methods

Bacterial strain

The avian pathogenic *Escherichia coli* strain APEC9 used in this study was recovered from the trachea of a colisepticemic chicken (VIDOTTO et al., 1990). This strain shows resistance to tetracycline, ampicillin and serum complement. It produces colicin V, and has an iron uptake system mediated by aerobactin and carries one large plasmid of approximately 120 kilobases (Kb) (VIDOTTO et al., 1990). The APEC9 strain presented serotype O2:H9:K1 (MOURA et al., 2001) and was pathogenic to 1-day-old chickens by means of pathogenicity test, presenting LD₅₀ of 1 x 10⁵ cells/ml. The *iutA*, *tsh*, *iss*, *papC*, *papG* and *cvaC* genes were detected in the *E. coli* APEC9 strain (DELICATO et al., 2002; DELICATO et al., 2003).

Cloning and sequence analysis of the iss gene

The entire *iss* open reading frame was amplified from APEC9 genomic DNA by PCR. A pair of primers was constructed according to sequences in GenBank, *iss* forward 5' - ATGATGCAGGATAATAAGATGAAAAAATG - 3' and *iss* reverse-5'- CTATTGTGAGCAATATACCCGG - 3'. PCR was carried out in a total volume of 50 µl containing 50 ng of DNA template, 1 µl each of the primers at 20 pmol, and 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 2U Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Sao Paulo, Brazil). The PCR conditions were as follows: 94°C for 5 min followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 7 min in a thermal cycler (mastercycler

personal eppendorf®). The amplified DNA was visualized in 1.0% agarose gels stained with ethidium bromide.

PCR product was quantified and 50 ng were used as insert in the pET SUMO® vector (5.5 Kb) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Chemically competent *E. coli* host strain Mach cells (Invitrogen) were then transformed with 3 µl of the cloning reaction. The transformants colonies were selected on plates containing 30 µg of kanamycin, and the recombinants plasmids were extracted by alkaline lysis (SAMBROOK et al.,1990). The presence of *iss* genes were confirmed by PCR and subsequent restriction enzyme digestion of recombinant plasmids with EcoRI and SmaI. The correct position of *iss* gene was confirmed by sequencing with primers SUMO forward (5'-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3') T7 reverse (5'-TAGTTATTGCTGAGCGGTGG-3') and *iss* primers, utilizing commercial kit BigDye Terminator (Applied Biosystems, CA, USA).

The obtained sequences were analyzed by BLAST through the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) to verify the sequence identity. DNA and amino acid sequence analyses were carried out by the software “CAP3 Contig Assembly Program” and “ClustalW (1.81) Multiple Sequence Alignments” and “Six Frame Translation of Sequence”.

Expression of genes on E. coli strain and purification of recombinants Iss proteins.

The recombinant plasmids were utilized in transformation reactions with *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen Life Technologies, Sao Paulo, Brazil). The BL21/pET SUMO-*iss* strain was grown to an optical density of OD_{600 nm} 0.5, and IPTG (Invitrogen Life Technologies, Sao Paulo, Brazil) was added to 1mM and aliquots were removed at different times to choose the best time for expression. The cells were collected by centrifugation and treated with the buffer containing 6 M guanidine-HCl and sonicated on the ice with three 5-second pulses at the high intensity. The lysate was then centrifuged at 3000 x g for 15 min and the supernatant was transferred to Ni-NTA resin (Qiagen, Sao Paulo, Brazil); previously washed with the Denaturing Binding Buffer (8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0). The supernatant and resin were incubated for 1h on a rotation wheel. Then the resin was washed once with the Denaturing Binding Buffer at pH 8.0, twice with the buffer at pH 6.3, and three times with the buffer at pH 5.9. The protein was eluted using 8 M urea buffer at pH 4.0.

The protein concentration was measured using the Bradford method (1976) and analyzed on SDS-PAGE 15%.

Production of IgY and hyperimmune serum in hens

The procedures used were approved by the Ethics Committee for Experiments in Animals (CEEAA, n° 39/07), Universidade Estadual de Londrina. Two Shaver breed chickens were utilized for the production of IgY anti-rISS. Each animal received three inoculations of 100µg (LARSSON et al, 1998) of protein at intervals of 14 days by the intramuscular via. During the first inoculation the complete Freund adjuvant (Sigma Immuno Chemicals, Sao Paulo, Brazil) was used, while the incomplete Freund adjuvant was administered in all other inoculations. The eggs were collected daily, beginning one week before immunization until two weeks after the last inoculation. The IgY extraction was realized as described Akita et al. (1993). The IgY purifyty was then centrifuged, the obtained sediment resuspended in sterile water dialysed and maintained at - 20 °C until usage.

Extractions of post-immunization IgY were adsorbed with *E. coli* BL21 Star for use in Western blott.

SDS PAGE and Western blotting

The expression and the localization of recombinant ISS was demonstrated by SDS-PAGE and Western blot. Purified recombinant proteins were loaded in an 15% SDS-PAGE gel. The gel were either stained with Comassie Brillhant blue or transfer to a nitrocellulose membrane (Amersham International, Amersham, UK) for Western blotting analysis (TOWBIN and GORDON, 1984). The membrane was blocked with 5% skim milk for 1 h at room temperature, washed in PBS-T (PBS + 0.1% Tween 20), and incubated for 1h with a 1:500 dilution of anti-rISS. The membrane were then incubated with chicken anti-IgY (1:10,000) stained with peroxidase (Sigma). The membrane were washed and the rISS were detected by means of the enhanced chemiluminescence (ECL) Western Blotting System (Amersham International, Amersham, UK). Protein molecular mass markers were used as standards.

Results

The insertion of the *iss* gene of APEC9 into the plasmids pETSUMO/*iss* was confirmed. The recombinant plasmid pETSUMO/*iss*, which was cleaved with the enzyme EcoRI, presented molecular mass of 5.8 Kb, 5.5 Kb of the vector and 0.3 Kb of the *iss* gene (Fig. 1). The *iss* gene was amplified using the pETSUMO/*iss* plasmids, and the sequence of the *iss* gene showed that it was inserted at the correct positions into the vector.

The complete *iss* sequence from APEC9 was deposited in GenBank (Accession N^o-bankit 1175137). The Figure 2 shows the alignment of the *iss* sequence from APEC9 with the sequence of three genetically distinct alleles of *iss*, designated *iss* types 1 to 3 and with the *bor* sequence, demonstrating that APEC9 has the *iss* gene type 1. There was 100% of similarity among the *iss* sequence from APEC9 with those of others APEC strains isolated of different countries and different serotypes; from USA O1:K1 (DQ381420), O2 (AF042279, AY545598), O78:K80 (AF449498), O103 (CP001232); from Australia O non-typeable:H28 (EU330199); from Iran O78 (FJ416147) and from China O1 (DQ295188), O2 (DQ295187), O78 (DQ309288, DQ309289, DQ309290, O109 (DQ309281, DQ309291), O119 (DQ309292). Also, this sequence type 1 was found in chicken fecal strain O5 from China (DQ299279, DQ29980, DQ299399, DQ299400).

The Fig.3A shows the rIss protein, an expected band around 22 kDa, corresponding 11 kDa of ISS and 11 kDa of SUMO protein, which was more evident after 4 h of induction with IPTG (lane 3). This band was observed in the insoluble fraction or inclusion bodies and was absent in the negative control. rISS was solubilized and purified with the Ni-NTA purification system under denaturing conditions. The results obtained from SDS-PAGE showed that rISS was successfully expressed in BL21 (DE3) and purified by means of Ni-NTA resin (Fig.3 A, lane 4), although the SUMO-ISS was not cleaved with SUMO protease at different conditions as manufacturer's recommendations.

The expression of rISS protein and its reactivity with the hen hyper-immune serum by Western blotting are shown in Figure 3 B.

Discussion

APEC has been widely studied for its role as agent extraintestinal infections, which causes high losses in the poultry industry (MINHARRO et al., 2001; ASSIS et al., 2003; BARNES and GROSS, 1997). The most important gene responsible by serum resistance presented by APEC is the *iss* gene (LYNNE et al., 2007; BINNS et al., 1982; PFAFF-MCDONOUGH et al., 2000).

Recently, the differentiation of the three *iss* gene allele types in *E. coli* provides an additional tool for discriminating among *E. coli* pathotypes (JOHNSON et al., 2008). The plasmid-borne *iss* allele (designated type 1) was highly prevalent among APEC (78%) and neonatal meningitis-associated *E. coli* isolates (66%) but not among uropathogenic *E. coli* isolates. The types 2 and 3 was highest among necrotoxicogenic and human ExPEC strains, respectively (JOHNSON et al., 2008). The different *iss* types appear to have evolved from a *bor*-containing phage precursor, with several key events leading to the current *iss* alleles present on different prophage elements and conjugative plasmids (JOHNSON et al., 2008).

In this work, we sequenced the *iss* sequence from APEC9 (O2:H9:K1) and the alignment this sequence with those described in the GeneBank showed that it belong to *iss* type 1. This sequence has 100% of similarities with those of different serotypes APEC strains from of USA, Australia, Iran and China. In China the sequence type 1 was found in *E. coli* O5 strain isolated from chicken fecal, however we found *E. coli* O5 as APEC in Brazil (MOURA et al., 2001).

The *iss* type 1, as well as others genes associated with the virulence of APEC, is commonly plasmid-linked (JOHNSON et al., 2002, 2006; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a, 2005b; SKYBERG et al., 2006) and the APEC plasmids may serve as reservoirs of resistance or virulence genes for human ExPEC. Thus, APEC could be a possible source of UPEC causing UTIs or other diseases in human beings (EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2007; RAMCHANDANI, 2005; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a). Several plasmid-linked APEC-derived sequences (*tsh*, *cvaB*, *traR*, *traC* and *sopB*) were predominantly present in APEC, as compared to UPEC (KARIYAWASAM et al., 2007), however the *iss* gene of UPEC is commonly found in the chromosome and it is of the *iss* type 2 (JOHNSON et al., 2008). In our analysis, the *iss* type 1 was found in only a plasmid of UPEC (AY205565).

ISS and Bor proteins are exposed on *E. coli* outer membrane where they may be recognized by the host's immune system (LYNNE et al., 2007). In this work, the *iss* gene was successfully cloned into pETSUMO and the recombinant protein SUMO-Iss was purified in Ni-NTA resin with denaturing conditions. Although SUMO, expressed by pETSUMO vector, increases the solubility of recombinant proteins, the results showed that rIss is insoluble. The SUMO-Iss was not cleaved with SUMO protease and the antibodies elicited by SUMO-Iss were directed against SUMO and not Iss. This response can be due the size of SUMO that is two times the size of Iss. Others authors also cloned the *iss* gene, but they used the pGEX-6P-3 vector, and the purification of protein was by affinity chromatography with Glutathione-Sepharose (FOLEY et al., 2000; LYNNE et al., 2006a). However, chicken immunize with GST-Iss were able to produce antibody against Iss (LYNNE et al., 2006a).

In conclusion, the *iss* gene from APEC 9 strain is the genotype 1 that is highly prevalent among APEC and it could be used in diagnostic protocols.

Acknowledgments

This work was supported by the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq).

References

AKITA, E.M. e NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, v.160, p.207–214, 1993.

ASSIS, M.T.Q.M.; GRUBER, G.L.; HOFMEISTER, A.W.; GUIMARÃES, A.M.P. Avaliação do percentual de descarte na condenação parcial de frangos. **Revista Nacional da Carne**, n.313, p.22-31, 2003.

BARNES, J.H. e GROSS, W.B. Colibacillosis. In: CALNEK, B.W. **Diseases of poultry**. 10th ed. Ames, p.131-139. 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein **Analitycal Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BINNS, M.M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R.P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of ColIV, I-K94. **Infection and Immunity**, v.35, n.2, p. 654-659, 1982.

CHUBA, P.J.; PALCHAUDHURI, S. and LEON, M.A. Contributions of *traT* and *iss* genes to the serum resistance phenotype of plasmid ColIV2-K94. **FEMS Microbiology Letters**, v.37, p.135–140, 1986.

DELICATO, E.R.; BRITO, B.N.; GAZIRI, L.C.J. and VIDOTTO, M.C. Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**, v.94, p.97-103, 2003.

DELICATO, E.R.; BRITO, B. G.; KONOPATZKI, A.P.; GAZIRI, L.C. J. AND VIDOTTO, M.C. Occurrence of the Temperature-Sensitive Hemagglutinin Among Avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.46, n.3, p.713–716, 2002.

DHO-MOULIN, M. e FAIRBROTHER, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* APEC. **Veterinary Research**, v.30, p.299-313,1999.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIEBLING, S.; ALT, K.; ANTÁO, E.M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BÖHNKE, U.; STEINRÜCK, H.; PHILIPP, H.C. AND WIELER, L.H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v.297, n.3, 11, p. 163-176, 2007.

FOLEY, S.L.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W., ROBINSON, M. and NOLAN, L.K. *Iss* from a virulent *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.44, p.185-191, 2000.

GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; SKYBERG, J.; OLAH, P.; KERCHER, R.; SHERWOOD, J.S.; FOLEY S.L. and NOLAN, L.K. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**, v.46, p.342-352, 2002.

GROSS, W.B. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry, In: GYLES, C.L. ***E. coli* in domestic animals and man**. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p.237-259.

HORNE, S.M.; MCDONOUGH, J.P.; GIDDINGS, C.W.; NOLAN, L.K. Cloning and sequencing of *iss* gene from virulent avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.44, p. 179-184, 2000.

JOHNSON, T.J.; JOHNSON, S.J.; NOLAN, L.K., Complete DNA Sequence of a ColBM Plasmid from Avian Pathogenic *Escherichia coli* Suggests that It Evolved from Closely Related ColV Virulence Plasmids. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.16, p.5975–5983, 2006.

JOHNSON, T.J.; KARIYAWASAM, S.; WANNEMUEHLER, Y.; MANGIAMELE, P.; JOHNSON, S.J.; DOETKOTT, C.; SKYBERG, J.A., LYNNE, AM, JOHNSON, J.R.; NOLAN, L.K. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.3228-3236, 2007.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y. M. and NOLAN, L.K. Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli*, **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.8, p.2360–2369, 2008.

JOHNSON, T.J.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; SKYBERG, J.; OLAH, P.; KERCHER, R.; SHERWOOD, J.S.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L.K. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**, v.46, p.342-352, 2002.

KARIYAWASAM, S.; SCACCIANOCE, J. A.; NOLAN, L. K. Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. **BMC Microbiology**, v.7, n.81, 2007.

LA RAGIONE, R.M; WOODWARD, M.J.; Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia-Review article. **Research in Veterinary Science**, n.73, p.27–35, 2002.

LARSSON, A.; CARLANDER, D. AND WILHELMSSON, M. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. **Food and Agricultural Immunology**, v.10, p.29–36, 1998.

LEYING, H., S. SUERBAUM, H. P. KROLL, D. STAHL, AND W. OPFERKUCH. The capsular polysaccharide is a major determinant of serum resistance in K-1-positive blood culture isolates of *Escherichia coli*. **Infection and Immunology**, v.58, p.222–227, 1990.

LYNNE, A.M.; SKYBERG, J.A.; LOGUE, C.M.; NOLAN, L.K. Detection of Iss and Bor on the surface of *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.660-666, 2007.

MINHARRO, S.; LINHARES, G.F.C.; ANDRADE, M.A.; ROCHA, P.T.; SANTANA, A.P. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v.2, n.2, p.111-117, 2001.

MOURA, A.C.; IRINO, K.; VIDOTTO, M.C., Genetic Variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v.45, p.73-81, 2001.

PFAFF-MCDONOUGH, S.J.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; EBERT, J.O.; DOEKOTT, C.; SMITH, M.H. and NOLAN, L.K. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds with colibacillosis. **Avian Diseases**, v.44, p.23-33, 2000.

RAMCHANDANI, M.; MANGES, A.R.; DEBROY, C.; SMITH, S.P.; JOHNSON, J.R. AND RILEY, L.W. Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Infectious Diseases**, v.40, p.251-257, 2005.

RODRIGUEZ-SIEK, K.E.; GIDDINGS, C.W; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; and NOLAN, L. K. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, v.36, p.241–256, 2005a.

RODRIGUEZ-SIEK, K.E.; GIDDINGS, C.W; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T.J.; FAKHR, M.K. and NOLAN, L.K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v.151, p.2097-110. 2005b.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning – A laboratory manual. 3 vols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

SIMÕES, R. C.; KOBAYASHI, R. K. T.; GAZIRI, L. C. J.; VIDOTTO, M. C. Cloning, sequencing, expression, and characterization of the *tsh* gene from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Semina Ciências Agrárias**, v.27, p.253-260, 2006.

SKYBERG, J. A.; JOHNSON, T. J.; JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C. LOGUE, C. M. E NOLAN, L. K. Acquisition of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Plasmids by a Commensal *E. coli* Isolate Enhances Its Abilities To Kill Chicken Embryos, Grow in

Human Urine, and Colonize the Murine Kidney. **Infection and Immunity**, v. 74, n.11, p. 6287–6292, 2006.

TOKANO, D.V.; KAWAICHI, M.E; VENÂNCIO, E. J. and VIDOTTO, M. C. Cloning and characterization of the iron uptake gene *IutA* from Avian *Escherichia coli*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, n.3, p473-482, 2008.

TOWBIN, H. and GORDON, J. Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook **Journal of immunological methods**, v. 72, n .2, p.313-340, 1984.

VANDEKERCHOVE, D.; VANDEMAELE, F.; ADRIAENSEN, C.; ZALESKA, M.; HERNALSTEENS, J. P.; DEBAETS, L.; BUTAYE, P.; VAN IMMERSEEL, F.; WATTIAU, P.; LAEVENS, H.; MAST, J.; GODDEERIS, B. and PASMANS, F. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: Comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. **Veterinary Microbiology**, v.108, p.75-87, 2005.

VIDOTTO, M.C.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.A.; GUIMARÃES, I.G.; SANTOS, D.S. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.34, p.531-538, 1990.

WEISER, J.N., and GOTSCHLICH, E.C. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. **Infection and Immunology**, v.59, p.2252–2258, 1991.

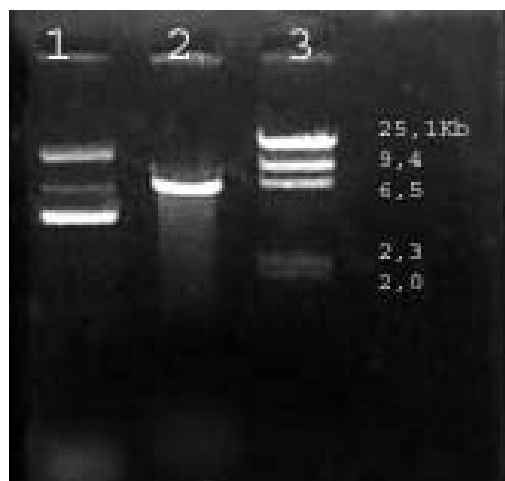


Figure 1. Agarose gel with pETSUMO/*iss*.
1- pETSUMO/*iss*; 2- pETSUMO/*iss*
clived with EcoRI; 3- lambda HindIII.

ISS APEC	ATGAAAAAA	TGTTATTTTC	TGCCGCTCTG	GCAATGCTTA	TTACAGGATG	TGCTCAACAA	ACGTTTACTG	TTGGAAACAA
Type 1
Type 2G.....G.....
Type 3G.....G.....
BorC...C.CG.A.T.....CC.....A.....CA.....
	90	100	110	120	130	140	150	160
ISS APEC	ACCGACAGCA	GTAACACCAA	AGGAAACCAT	CACTCATCAT	TTCTTCGTTT	CGGGAATTGG	ACAAGAGAAA	ACTGTTGATG
Type 1
Type 2C...CG.....
Type 3T.....C.....G..GA.....C.....
BorA.....G.....	AGGAAACCATC.....T.....G..GA.....C.....
	170	180	190	200	210	220	230	240
ISS APEC	CAGCCAAAAT	TTGTGGCGGT	GCAGAAAATG	TTGTTAAAAC	AGAAACTCAG	CAAACATTCG	TAAATGGATT	GCTCGGTTTT
Type 1
Type 2C.....
Type 3A.....T.....C.....
BorT.....C.....C.....
	250	260	270	280	290			
ISS APEC	ATCACTTTTG	GCATCTATAC	TCCGCTGGAA	GCCCGGTAT	ATTGCTCACA	ATAG		
Type 1		
Type 2T.....A.....T.....T..GTA		
Type 3T.....A.....T.....T..GTA		
BorT.....A.....T.....T..GTA		

Figure 2. Alingment of *iss* gene of APEC 9 strain from Parana State-Brazil and *iss* type 1, 2, 3, and *bor* genes sequences, indicating the nucleotides that are different from APEC 9 and type 1 sequences.

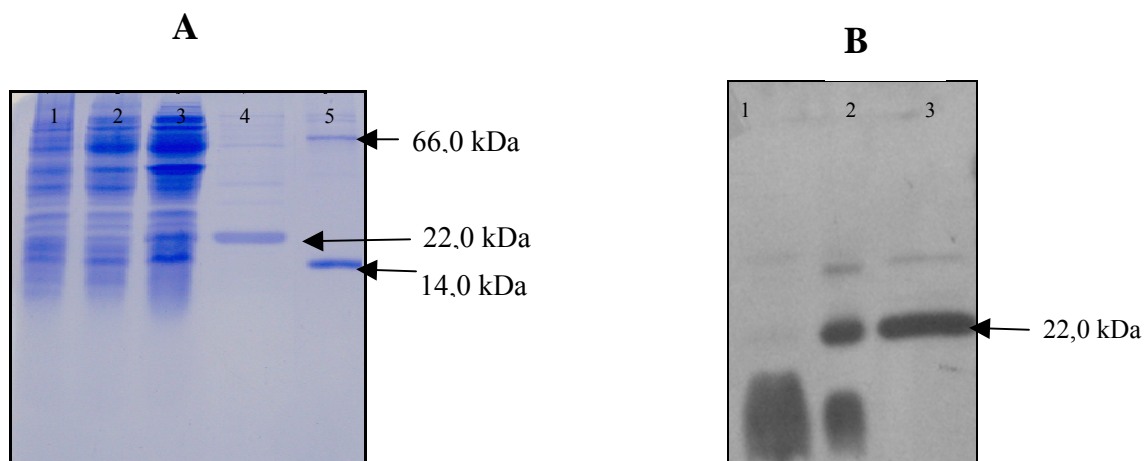


Figure 3. Expression of the rISS protein by clone *E. coli*/pETSUMO-*iss* and immunological response of this protein in chickens. (A) SDS-PAGE 15% stained with Comassie brilliant blue. Lane 1- *E. coli* BL21; lane 2 - clone BL21/pETSUMO-*iss* non induced; lane 3 - clone BL21/pETSUMO-*iss* induced with IPTG 1mM; lane 4 - eluted rIss; lane 5 - Mass Molecular. The band of approximately 22 kDa corresponding to Iss protein. (B) Western blot with anti-rIss IgY and anti-chicken IgY conjugated with peroxidase. Lane 1 - *E. coli* BL21; lane 2 - clone BL21/pETSUMO-*iss* induced with IPTG 1mM; lane 3 - eluted rIss. The band of approximately 22 kDa corresponding to recombinant Iss protein.

3.2. “Avaliação da atividade biológica do anticorpo IgY anti-proteína recombinante ISS de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC)”

BAPTISTA, A.A.S.¹; KOBAYASHI, R.K.K.²; VIDOTTO, M.C.¹

¹Depto. Medicina Veterinária Preventiva/CCA/UEL. ²Depto. de Microbiologia/CCB/UEL.

Campus Universitário. Caixa Postal 6001, CEP: 86051-970, Londrina, PR.

E-mail: angelita_sampaio@yahoo.com.br

Resumo

Escherichia coli é o agente responsável pela colibacilose aviária, a qual é uma das principais causas de prejuízos econômicos na avicultura industrial moderna, decorrente do aumento da mortalidade, dos custos com tratamento e da condenação de carcaças no abatedouro. A patogenicidade das amostras de APEC está relacionada com a presença de um ou mais fatores de virulência, sendo um dos principais fatores a proteína ISS, codificada pelo gene *iss* (*increased serum survive*), que confere resistência ao sistema complemento, aumentando a capacidade das amostras de APEC em resistir às defesas imunológicas. O objetivo deste estudo foi obter e avaliar a atividade de IgY/rISS sobre o crescimento bacteriano de APEC e sobre a capacidade de imunoproteção em pintinhos de um dia. O gene *iss* foi obtido pela PCR de um isolado de APEC e clonado no vetor pET30. A proteína foi induzida com IPTG e purificada em coluna de resina ligada ao níquel. A proteína rISS foi separada em SDS-PAGE (15%) e inoculado três doses de 100µg de proteína nos animais com intervalo de 15 dias. A IgY/rISS foi extraída dos ovos, e demonstrou reatividade no Western blot com rISS e BL21/pET30*iss* induzida apresentando massa molecular de aproximadamente 14kDa. A produção de IgY/ rISS foi avaliada por meio de técnica de ELISA, e foi observado que os níveis de anticorpos aumentaram ao longo das semanas pós imunização. O anticorpo IgY/rISS diminuiu significativamente ($P<0,01$) o crescimento bacteriano na presença de soro, pelo teste de inibição a atividade sérica, e diminuiu o escore de lesões de aerossaculite apresentadas pela APEC9, no teste de imunoproteção de pintinhos de 1 dia.. Os resultados deste trabalho permitem concluir que rISS foi capaz de induzir a produção de IgY anti-rISS e estes atuaram de maneira significativa sobre o crescimento bacteriano e diminuição do grau lesões de aerossaculite.

Palavras-chave: *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC). Iss recombinante. Resposta imune.

Introdução

Escherichia coli, é um dos principais agentes oportunistas e agressores do trato respiratório das aves, causando um sério prejuízo econômico para o setor avícola. A utilização de vacinas é uma estratégia que permite minimizar o risco de doenças nos plantéis. Atualmente, com o avanço da biologia molecular e imunologia, novas estratégias estão sendo aplicadas para o desenvolvimento de vacinas eficientes e seguras.

As linhagens de *E. coli* patogênicas encontradas em aves, denominadas “*Avian Pathogenic E. coli*” (APEC) estão associadas com infecções extraintestinais no trato respiratório, cutâneas e/ou sistêmicas, (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999). As infecções causadas por APEC são designadas colibacilose aviária, a qual é uma das principais doenças de impacto na avicultura industrial moderna, devido aos grandes prejuízos econômicos causados mundialmente por quadros como: colisepticemia, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, aerossaculite, pericardite, celulite, coligranuloma, doença crônica respiratória complicada (DRCC), onfalite, salpingite, síndrome da cabeça inchada (SCI), panoftalmia, osteomielite, ooforite e sinovite (FERREIRA e KNÖBL, 2000; GROSS, 1994; LA RAGIONE, 2002). Os prejuízos econômicos decorrentes desta enfermidade vão desde aspectos relacionados ao comprometimento do crescimento, da conversão alimentar e da uniformidade dos lotes (MINHARRO et al., 2001; ASSIS et al., 2003) assim como custos com tratamento, mortalidade de animais e condenação de carcaças no abatedouro (BARNES e GROSS, 1997).

Estudos têm demonstrado significativa diferença na incidência de fatores e genes de virulência em amostras de *E. coli* patogênicas e comensais. Atribuindo uma forte associação entre APEC e fatores/genes de virulência, o que sugere um importante papel destes na patogenicidade das amostras (YAGUCHI et al, 2007).

Genes associados à APEC, dentre os quais estão presente “*increased serum survive*” (*iss*), hemaglutinina sensível a temperatura (*tsh*) e colicina V (*cvaC*), tem sido

estudados na tentativa de encontrar uma correlação destes com a patogenicidade das amostras (DELICATO et al., 2003; SKYBERG et al., 2003).

O gene *iss* foi descrito pela primeira vez por Binns et al. (1979), por seu papel na resistência ao soro associado com o plasmídeo que codifica a produção de colicina (ColV) em isolados de *E. coli* humana, aumentando em 100 vezes a virulência de *E. coli* em pintainhos de um dia de idade (BINNS et al., 1979). Johnson et al. (2006) localizaram o gene *iss* na ilha de patogenicidade presente no plasmídeo ColV/BM, que comumente ocorre em amostras de APEC, localizado em uma região altamente conservada do plasmídeo. Em outros estudos, Johnson et al. (2002), descreveram a localização do mesmo gene no plasmídeo conjugativo R (100kb) presente em amostras de APEC, juntamente com outros genes de virulência e de resistência a antimicrobianos. A transferência deste plasmídeo, por conjugação, para outras bactérias avirulentas, inclusive outras *E. coli*, pode conferir a estas a capacidade de produzir colicina, aerobactina, resistência à ampicilina, à tetraciclina e ao complemento (JOHNSON et al., 2002).

A proteína ISS, codificada pelo gene *iss*, é uma lipoproteína de 10-11 kDa localizada na membrana externa bacteriana, e contém 102 aminoácidos (HORNE et al., 2000; NOLAN et al., 2003). Iss é responsável pelo bloqueio do complexo terminal do sistema complemento que atua na membrana celular causando a lise bacteriana (BINNS et al., 1982). A habilidade em restringir o depósito da proteína C3, do sistema complemento, sobre a superfície bacteriana, confere ao microorganismo a capacidade de sobreviver na presença de soro (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999), driblando o sistema complemento, o qual é o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas, já que promove a opsonização e lise do agente infeccioso (BINNS et al., 1982).

A análise da seqüência de aminoácidos da proteína ISS sugere várias regiões como antigênicas (HORNE et al., 2000; LYNNE et al., 2006a), indicando ser um bom imunógeno e um forte candidato a formulação de vacinas e a protocolos de diagnóstico (LYNNE et al., 2006a; 2006b; 2007). Porém, existe a necessidade de estudos para se determinar e definir melhor a contribuição do gene *iss* na patogênese da colibacilose aviária, além de explorar a eficácia da proteína Iss como uma vacina.

Considerando a importância do setor avícola para a economia do país e a correlação existente entre o gene *iss* e amostras virulentas de *Escherichia coli* e a necessidades de estudos sobre tal gene, foi realizado este trabalho com o objetivo de

produzir anticorpos IgY/ rISS, verificar a sua atividade sobre o crescimento bacteriano e sobre a capacidade de imunoproteção de pintinhos de 1 dia.

Material e métodos

Amostra bacteriana

A amostra de *Escherichia coli* patogênica para aves - APEC9 (O2:H9:K1) usada neste estudo foi isolada da traquéia de frangos com colisepticemia (MOURA et al., 2001). Esta bactéria é resistente à tetraciclina e ampicilina, apresenta habilidade em resistir ao soro, produz colicina V e tem sistema de captação de ferro mediado por aerobactina, além de possuir um plasmídeo de aproximadamente 120 Kb (VIDOTTO et al., 1990). Os genes *iss*, *iutA*, *tsh*, *papC*, *papG* e *cvaC* foram detectados em APEC9 (DELICATO et al., 2002; DELICATO et al., 2003).

Clonagem do gene *iss* e expressão da proteína recombinante

O gene *iss* foi sub-clonado do plasmídeo pETSUMO/*iss* (Baptista et al., 2007) e clivado com as endonucleases de restrição Hind III e EcoRI (Invitrogen™ Life Technologies®) no vetor pET30 (Novagen). A reação de clivagem foi verificada em gel de agarose 1,5% e o fragmento *iss* foi recortado do gel e purificado usando Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA), conforme especificações do fabricante. O gene *iss* foi incubado com 50 ng do vetor pET 30 linearizado com as enzimas Hind III e EcoRI, 1 µl de T₄ DNA ligase 400U µl⁻¹ (Invitrogen™ Life Technologies®) num volume total de 20 µl por 16 horas à 16°C. A bactéria *E. coli* TOP10 (Invitrogen™ Life Technologies®) competente foi transformada com a mistura de ligação (pET30/*iss*), e algumas colônias transformantes selecionadas em LB ágar contendo canamicina (30 µg/mL) foram crescidas em caldo LB com antibiótico (30 µg/mL) para extração do plasmídeo recombinante (pET30/*iss*), pela técnica de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1990).

Para confirmar a sub-clonagem do gene *iss* e se o inserto estava em fase no vetor, o pET30/*iss* foi digerido com endonuclease de restrição Hind III e SmaI e foi realizada a técnica da PCR com os primers *iss* Iss/For 5' –

ATGCAGGATAATAAGATGAAAAAATG – 3' e Iss Ver 5' – CTATTGTGAGCAATATACCCGG – 3'. O resultado da clivagem foi verificado em gel de agarose 0,8%. Após a confirmação da presença do gene, *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen™ Life Technologies ®) competente foram transformadas com pET30/*iss*, para a expressão da proteína recombinante ISS (rISS).

Para induzir a expressão da proteína rISS, *E. coli* BL21/*iss*, foi crescida em caldo LB com canamicina (30 µg/mL) até atingir densidade óptica (DO₆₀₀) de 0,6, em que foi adicionado 1mM de Isopropil-thio-D-Galactoside (IPTG) (Sigma-Aldrich) e incubado a 37°C, com agitação. Alíquotas de hora em hora foram retiradas para selecionar o melhor tempo de indução. A expressão de rISS, foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%). Após a confirmação da expressão da proteína recombinante, a cultura obtida em larga escala foi centrifugada para a obtenção do precipitado, contendo as células transformadas, o qual foi armazenado a -20°C até o uso.

Purificação da proteína recombinante

A purificação da rISS foi realizada sob condições desnaturantes, por cromatografia de afinidade ao metal imobilizado Ni-NTA (QIAGEN - Integrated Solutions for the Life Sciences), segundo protocolo do fabricante, e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Imunização de galinhas poedeiras e extração da imunoglobulina da classe Y (IgY)

Os procedimentos realizados nos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CCEA n° 39/07. Para o ensaio foram utilizadas duas galinhas poedeiras Hy Line, com 20 semanas de idade, alojadas em gaiolas individualizadas, recebendo água potável e ração de postura *ad libidum*. Cada ave foi imunizada com 100 µg rISS (LARSON et al., 1998) emulsificada com ISCOMATRIX adjuvante, via intramuscular, sendo realizada três imunizações com intervalos de 15 dias.

Os ovos foram coletados diariamente e armazenados a 4°C até o momento da extração da IgY, a qual foi realizada de acordo com a técnica de precipitação por sulfato (AKITA e NAKAI, 1993; AKITA e NAKAI, 1994) modificada, que consistiu em, após separar as gema das clara, realizar a diluição das gemas com água destilada pH 2,5 (1:5)

e em seguida congelar a -20°C por 24 h. No dia seguinte a solução foi descongelada e filtrada com auxílio de papel filtro, ao filtrado foi adicionado sulfato de amônio, para se obter concentração final de 35% e homogeneizado por 15 min. Após 1h de repouso foi centrifugado a 5000rpm por 15 min a 4°C . O precipitado foi ressuspensão em água destilada estéril e submetido à diálise contra água por 24 h e contra PBS por mais 24 h. Após a diálise foi adicionado timerosal na concentração final de 0,02% e o produto foi armazenado a 4°C até o momento do uso.

Teste de ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay)

Inicialmente uma placa de poliestireno com 96 orifícios (Costar 3590, Corning) foi adsorvida com rISS e incubada *overnight* a 4°C . No dia seguinte foi lavada com solução de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) e bloqueada com PBS-Leite 5% por uma hora. As gemas dos ovos dos dias 0, 7, 15, 30 e 37 pós imunização foram diluídas em PBS-Leite 1% (1:500), distribuídas em duplicata na placa (100 μl /poço) e esta incubada a 25°C por uma hora. Logo após, a placa foi lavada com solução de lavagem e submetida à incubação com anticorpo secundário, anti-*chicken* marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich), na diluição de 1:40.000. A seguir a placa foi novamente lavada, e então acrescentado o substrato cromogênico (3, 3', 5, 5' – tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) diluído em tampão acetato. Passados 15 minutos, a reação foi bloqueada com 50 μl /poço H_2SO_4 1N, e a leitura realizada em espectrofotômetro de microplacas (Thermo Plate – TP Reader), com filtro de 450nm.

Detecção de anticorpos anti-rISS pela técnica de Western blot

A proteína rISS foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% e posteriormente, transferida para a membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences 0.45nm). A qual foi bloqueada por uma hora em tampão de bloqueio (PBS + 0,1% Tween 20 + 5% leite em pó desnatado) e em seguida, incubada por mais uma hora com o anticorpo primário (IgY anti-rISS adsorvido em BL21) na diluição de 1:500 e após, submetida a lavagem cinco vezes de 10 min com solução de lavagem (PBS + 0,1% tween 20) e posteriormente à incubação, por uma hora, com anticorpo secundário marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich), na diluição de 1:10,000. Após a incubação,

foram realizadas 5 lavagens de 5 min com PBS e tween 20 a 0,1%. E a revelação da membrana foi por quimioluminescência (ECL – NEN Life Science Products).

Teste de resistência sérica e de inibição da atividade sérica

Para este ensaio, foi colhido o sangue de galinhas poedeiras não imunizadas. Após a coagulação do sangue, o mesmo foi refrigerado a 4°C por uma hora, para a obtenção do soro, em seguida centrifugado a 2000 rpm por 10 min a 4°C. O soro obtido foi mantido refrigerado até o momento do uso.

A amostra bacteriana APEC9 e BL21, foram cultivadas em caldo LB, por 24 h a 37°C sob agitação, diluídas 1:100 e repicadas até atingir a fase log. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 2 min e ressuspensas em PBS pH 7,4 estéril. Em microplacas de 96 (Costar 3590, Corning) com fundo chato, 87,5µl de suspensão bacteriana e 50µL de soro de galinha (concentração final de 36%) foram incubados a 37°C. A densidade ótica foi mensurada por espectrofotômetro (Thermo Plate – TP Reader), com filtro de 450nm, nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min de incubação (PERKONEM e FILE, 1987).

Para teste de inibição da atividade sérica, 87,5µl de suspensão bacteriana foi centrifugado a 1000 rpm 2 min e ressuspensão em 87,5µl IgY anti-rIss e incubado juntamente a 50 µl de soro de galinha, nas cavidades da microplacas de fundo chato (Costar 3590, Corning). Os tratamentos realizados estão demonstrados na Tabela 1. A determinação da densidade ótica procedeu-se conforme descrito para o teste de resistência sérica.

Tabela 1. Tratamentos realizados no experimento de inibição da atividade sérica na presença de IgY-rIss

Tratamentos	Descrição
T1	PBS+SA*
T2	APEC9+ SA*
T3	APEC9+SA*+IgY/rIss
T4	BL21+SA*
T5	BL21+SI**
T6	BL21+SI**+IgY/rIss

- SA - soro com sistema complemento ativo.
- ** SI - soro com sistema complemento inativado a 56°C por 30 min.

Teste de imunoproteção passiva de pintinhos de um dia com IgY/rISS

O delineamento experimental de imunoproteção de pintainhos foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e quatro repetições por tratamento. Cada repetição foi composta por quatro animais, totalizando 16 pintainhos por tratamento. Os animais de cada repetição foram alojados em gaiolas e receberam ração potável e água *ad libitum*. Foram classificados por grupos: Grupo 1 (G1) ou controle positivo, em que os animais receberam via intramuscular e via sacos aéreos 100 µl de PBS. No grupo 2 (G2) ou controle negativo os animais foram apenas desafiados 100 µl de suspensão bacteriana de APEC9 (10^6 CFU) via sacos aéreo torácico esquerdo (ANDREATTI FILHO et al., 1993). E o grupo 3 (G3) recebeu 50mg de IgY anti-rISS via intramuscular (KARIYAWASAM et al., 2004) no primeiro dia de idade e foram desafiados após 4 dias com 100 µl de suspensão bacteriana de APEC9 (10^6 CFU) via saco aéreo torácico esquerdo. Os animais foram monitorados por sete dias quanto à mortalidade e após o período de observação foram eutanasiados em câmara de CO₂, necropsiados e avaliado o escore de lesões macroscópicas de aerossaculite de acordo com Peighambari et al. (2000) modificado (Tabela 3), pericardite e perihepatite.

Estudos preliminares foram feitos para determinar o inóculo e a concentração de IgY no desafio e imunização dos animais, respectivamente. Os procedimentos realizados nos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CCEA n° 39/07.

Tabela 2. Graus de aerossaculite após infecção pela amostra APEC9 *Escherichia coli* patogênica para aves (10^6 CFU/ml).

Graus de aerossaculite	Descrição
Grau 0	Ausência de lesões
Grau 1	Saco aéreo levemente opaco com presença de 0-1 granulomas
Grau 2	Saco aéreo opaco com presença de 1-2 granulomas.
Grau 3	Saco aéreo esbranquiçado com presença de 2 ou mais granulomas
Grau 4	Saco aéreo amarelado com presença de 2 ou mais granulomas
Grau 5	Saco aéreo amarelado difuso bilateral com presença de 2 ou mais granulomas

Análise Estatística

Os experimentos de resistência e inibição da atividade sérica, foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ($P \leq 0,01$). Para a análise estatística foi utilizado o software BioStat 5.0 (AYRES et al., 2007).

O escore de lesão por aerossaculite foi submetido ao teste de Kruskal-Wallis, (ANOVA não paramétrico) $P \leq 0,05$. Para a análise foi utilizado o software Assistat 7.5.

Resultados

Clonagem, expressão e caracterização da proteína Iss recombinante

O gene *iss* de APEC9 foi inserido no vetor pET30, confirmado pela amplificação do produto da PCR de aproximadamente 0,3Kb usando o DNA total da *E.coli* TOP 10 pET 30/*iss* e primers específicos, e pela clivagem do pET30/*iss* com Hind III e SmaI. O pET30/*iss* apresentou massa molecular de 5,8 Kb, em que 5,42 Kb corresponde ao tamanho do vetor e 0,38 Kb do gene *iss* (Fig. 1).

A proteína recombinante rISS foi expressa em BL21 (DE3) após 4h de indução com IPTG. A rISS foi purificada por coluna de níquel em condições desnaturantes, eluída em pH 4,0 e visualizada em SDS-PAGE (15%) com massa molecular de aproximadamente 14 kDa (Fig. 2A) e com rendimento de aproximadamente 1mg/L.

Produção de anticorpos (IgY) anti- rIss

No teste imunoenzimático indireto (ELISA) foi detectado um aumento nos níveis de produção de IgY/rIss ao longo das semanas pós imunização atingindo pico de produção de anticorpos ao redor da quarta semana (Fig. 3).

No Western blotting, houve reatividade dos anticorpos (IgY) purificados dos ovos das galinhas imunizadas com rISS, contra BL21/rISS induzida e contra rISS purificada (Fig. 2B).

Teste de resistência sérica e inibição da atividade sérica

Os resultados obtidos no teste de resistência sérica, nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min de incubação, demonstram a resistência e sensibilidade ao soro das amostras APEC9 e BL21, respectivamente (Fig. 4). A incubação de APEC9 e BL21 em soro inativado (56°C) demonstrou que ambas foram capazes de crescer ao longo dos tempos, e que houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre o crescimento de BL21 em soro ativo e inativado.

A Figura 4 demonstra os resultados dos testes de inibição da atividade sérica na presença de IgY anti-rISS (25mg/mL), com diferentes tratamentos (Tab. 1). A APEC9 na presença de soro ativo apresentou diferença significativa na curva de crescimento ($P < 0,01$) em relação ao controle negativo. O crescimento da APEC9 diminuiu significativamente ($P < 0,01$) na presença de soro acrescido de IgY anti-rISS. A *E. coli* BL21, não apresentou crescimento tanto na presença de soro ativo como na presença de soro inativado adicionado de IgY anti-rISS, contudo na presença de soro inativado houve crescimento bacteriano.

Teste de imunoproteção em pintainhos de um dia com IgY anti-rIss

Não foi verificada mortalidade em nenhum animal dos grupos do experimento. Pelo escore de lesão de aerossaculite, foi possível verificar que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre todos os tratamentos (Tab. 3). Os animais do grupo 3, que receberam IgY anti-rISS, apresentaram significativa diminuição ($P < 0,05$) no escore de lesões de aerossaculite em relação aos animais dos Grupos 1 e 2, controles positivo e negativo, respectivamente. Não foram verificados lesão de perihepatite em nenhum dos animais do grupo 3, conforme foi observado em animais do grupo controle positivo.

Tabela 3. Análise estatística (ANOVA não paramétrico), do escore de lesão por aerossaculite, verificados no ensaio de imunoproteção de pintainhos.

Tratamentos	Repetições	Média
1	4	0.532 a
2	4	0.000b
3	4	0.300c

Discussão

Neste estudo o gene *iss* foi clonado no vetor pET30 e a proteína recombinante (rISS) após a sua expressão, foi purificada em coluna de níquel. Estes resultados são semelhantes àqueles encontrados por Foley et al. (2000) e Lynne et al. (2006a), os quais utilizaram o vetor pGEX-6P-3 e a purificação por cromatografia de afinidade com Glutathione-Sepharose (FOLEY et al, 2000; LYNNE et al. 2006a).

A capacidade imunogênica de rISS tem sido investigada e avaliada no que refere a indução de resposta protetora contra infecções por APEC. Lynne et al. (2006a) demonstraram que rISS pode contribuir significativamente na proteção de aves contra desafios por APEC e animais imunizados obtiveram aumento significativo no título de anticorpos séricos contra rISS.

Similarmente, foi possível verificar, em nosso estudo, que galinhas poedeiras imunizadas com rISS, apresentaram aumento dos níveis de imunoglobulina da classe Y (IgY) anti-rISS ao longo das semanas pós imunizações. Esta imunoglobulina é o anticorpo presente em aves, répteis e anfíbios e possui equivalência a IgG de mamíferos, embora exista diferenças estruturais entre elas (HAMAL et al., 2006). A IgY, como o próprio nome define *immunoglobulin of egg yolk* (IgY), é predominante na gema dos ovos (TINNI et al., 2001), e atua conferindo imunidade passiva aos recém-nascidos protegendo-os nas primeiras semanas de vida, já que nesta fase o sistema imune ainda não está completamente desenvolvido (HAMAL et al., 2006).

Os resultados referentes ao pico na produção de anticorpos (IgY) corroboram com os obtidos por Kariyawan et al. (2004), os quais verificaram aumento nos níveis séricos de IgY ao imunizar frangos com Fim-H e IutA recombinantes, na quarta semana pós imunização.

Neste estudo foi verificado que a proteína rISS foi capaz de induzir resposta imune humoral nas aves imunizadas, pela avaliação de reatividade dos anticorpos por Western blotting. Do mesmo modo, Lynne et al. (2006b) verificaram, ao utilizarem esse teste, a produção de anticorpos contra rISS e a reatividade destes contra a proteína recombinante. Contudo, esses autores, utilizaram anticorpos monoclonais para a detecção de ISS, diferindo desse estudo nessa estratégia. A localização de ISS na superfície bacteriana sugere, potencial capacidade de indução de resposta imune, dado sua possível interação com o sistema imune do hospedeiro (LYNNE et al. 2006a).

A capacidade de resistência ao soro é considerada um dos principais fatores de virulência de APEC, visto que o soro é a primeira linha de defesa contra organismos patogênicos, o sistema complemento quando ativado, resulta na opsonização para fagocitose e/ou formação do complexo de ataque à membrana (TYLER et al., 2008; WOLLEY et al., 1992). O gene *iss* é um dos principais responsáveis pela capacidade de resistência sérica em APEC (LYNNE et al., 2007; BINNS et al., 1979). No teste de resistência sérica, nossos resultados evidenciaram que APEC9, a qual possui o gene *iss*, é capaz de resistir aos efeitos líticos do soro, apresentando crescimento ao longo dos tempos de incubação, corroborando com resultados obtidos por Lynne et al. (2007), estes autores verificaram que a presença do gene *iss* conferia a capacidade de resistência sérica às amostras bacterianas pela deleção do gene *iss*, as quais tornavam-se sensíveis aos efeitos líticos do soro. Ao contrário *E. coli* BL21, que não possui o gene *iss*, foi sensível ao soro. Chart et al. (2000) ao investigarem as propriedades patogênicas de amostra de *Escherichia coli* BL21, observaram que esta é incapaz de crescer na presença de soro, e apresenta crescimento somente se, este estiver inativado, concordando com os resultados obtidos em nosso estudo.

O anticorpo IgY anti-rISS inibiu o crescimento da APEC9, a qual teve uma queda significativa de crescimento ao longo dos tempos de incubação (Fig.4). Resultados semelhantes foram observados por Yu-Hong et al. (2008) ao avaliarem a atuação de IgY específica sobre o crescimento de *Escherichia coli* O111 confirmando a efetividade em inibir o crescimento bacteriano, sugerindo seu uso terapêutico. Outros estudos têm demonstrado a potencial capacidade de IgY em atuar inibindo o crescimento bacteriano seja por precipitação, neutralização (AMARAL et al., 2008) ou ainda por agredir a membrana bacteriana resultando em alterações estruturais na superfície que comprometem o crescimento do microorganismo (LEE et al., 2002).

Neste trabalho a *E. coli* BL21 apresentou um crescimento estável na presença de IgY-rISS, comportamento já esperado visto que a IgY utilizada neste estudo foi policlonal e desse maneira existia a possibilidade de reconhecimento de epítomos comuns a APEC9 e BL21. Além disso, deve-se considerar as propriedades antimicrobianas de IgY (AMARAL et al., 2008; YU-HONG et al., 2008; LEE et al., 2002).

O anticorpo IgY anti-rISS também foi capaz de atuar diminuindo significativamente o grau de lesões de aerossaculite causados pelo desafio com *E. coli* APEC9 (10^6 CFU). Entretanto, não foi verificada mortalidade dos animais em nenhum

dos tratamentos, apesar de ser esperado nos grupos desafiados. Isto provavelmente ocorreu devido ao inóculo utilizado no desafio e a idade dos animais. A DL50 de APEC9 utilizada foi para pintainhos de 1 dia e os animais foram desafiados somente no quarto dia de vida, visto que a administração de IgY anti-rISS foi no primeiro dia de vida dos animais, e de acordo com Kariyawasam et al. (2004), o anticorpo atinge pico na circulação sanguínea, quando administrado via intramuscular, em aproximadamente três dias. Os resultados obtidos neste ensaio foram similares aos verificados com APEC O78, em que IgY produzidas contra os antígenos PapG, LPS, *E. coli* morta e *E. coli* viva e IutA protegeram os pintainhos desafiados por via sacos aéreos com *E. coli* O78 (KARIYAWASAM et al., 2004).

A atuação de IgY anti-rISS nos ensaios “*in vivo*” e “*in vitro*” são resultados interessantes que ampliam as perspectivas no que diz respeito a novos estudos sobre mecanismo de ação e novos ensaios “*in vivo*”, para averiguar a efetividade do anticorpo em situações semelhantes àquelas que ocorrem em produções industriais. Outro aspecto relevante dos resultados obtidos é a possibilidade da transmissão IgY/rISS via ovo de conferir imunidade passiva à progênie protegendo-a nas fases iniciais. Essa abordagem seria uma alternativa para proteger pintainhos de corte durante as primeiras semanas pós-nascimento, já que a colibacilose apresenta-se como uma patologia preocupante em virtudes dos riscos com mortalidade, custos com tratamento e perda de índices zootécnicos.

Referências

- ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N. e BALEN, L. Efeito da via de inoculação na patogenicidade de amostras patogênicas e apatogênicas de *Escherichia coli* em galinhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.45, n.5, p.475-486, 1993.
- AKITA, E.M. e NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, v.160, p.207–214, 1993.
- AKITA, E.M. e NAKAI, S. Preparation and purification of Fab' immunoreactive fragments from chicken egg immunoglobulin using pepsin and *Aspergillus saitoi* protease. In **Egg Uses and Processing Technologies** (ed. J.S. Sim and S. Nakai), p. 228–240. 1994.
- AMARAL, J.A.; DE FRANCO, M.T.; ZAPATA-QUITANILLA, L. e CARBONARE, S.B. *In vitro* reactivity and growth inhibition of EPEC serotype O111 and STEC serotypes O111 e O157 by homologous and heterologous chicken egg yolk antibody. **Veterinary Research Communications**, v.32, p.281-290, 2008.
- ASSIS, M.T.Q.M.; GRUBER, G.L.; HOFMEISTER, A.W.; GUIMARÃES, A.M.P. Avaliação do percentual de descarte na condenação parcial de frangos. *Revista Nacional da Carne*, n.313, p.22-31, 2003.
- AYRES, M.; AYRES Jr, M.; AYRES, D.L. e SANTOS, A.A.S. **BioEstat - Aplicações estatísticas na área biomédica**. Ong Mamiraua, Belém, Pará, 2007.
- BAPTISTA, A.A.S.; KOBAYASHI, R.K.T. e VIDOTTO, M.C. Clonagem, expressão e purificação da proteína ISS responsável pela resistência sérica de *Escherichia coli* patogênica para aves. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia 24, 2007, Brasília. **Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia** (resumo), Brasília, DF, p.300, 2007.
- BARNES, J.H. e GROSS, W.B. Colibacillosis. In: CALNEK, B.W. **Diseases of poultry**. 10th ed., Ames, p.131-139, 1997.
- BINNS, M.M.; DAVIES, D.L.; HARDY, K.G. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. **Nature**, v. 279, p.778-781, 1979.
- BINNS, M.M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R.P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes traT of R100 and *iss* of ColV, I-K94. **Infection and Immunity**, v.35, n.2, p. 654-659, 1982.
- BRADFORD, M. M. A rapid and method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHART, H.; SMITH, H.R.; LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5 α and EQ1. **Journal of Applied Microbiology**. v.89, p.1048-1058, 2000.

DELICATO, E.R., BRITO, B.N., GAZIRI, L.C.J., VIDOTTO, M.C. , Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**. v.94, p.97-103, 2003.

DELICATO, E.R.; BRITO, B. G.; KONOPATZKI, A.P.; GAZIRI, L.C. J. AND VIDOTTO, M.C. Occurrence of the Temperature-Sensitive Hemagglutinin Among Avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.46, n.3, p.713–716, 2002.

DHO-MOULIN, M. e FAIRBROTHER, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* APEC. **Veterinary Research**, v.30, p.299-313,1999.

FERREIRA, A.J.P e KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. IN: BERCHIERE JR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 197-205.

FOLEY, S.L.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W., ROBINSON, M. and NOLAN, L.K. Iss from a virulent *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.44, p.185-191, 2000.

GROSS, W.B. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry, In: Gyles C. L. ***E. coli* in domestic animals and man**. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p.237-259.

HAMAL, K. R.; BURGESS, S. C.; PEVZNER, I. Y.; ERF, G. F. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. **Poultry Science**, v. 85, p.1364-1372, 2006.

HORNE, S.M.; MCDONOUGH, J.P.; GIDDINGS, C.W.; NOLAN, L.K. Cloning and sequencing of *iss* gene from virulent avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.44, p. 179-184, 2000.

JOHNSON, T.J.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; SKYBERG, J.; OLAH, P.; KERCHER, R.; SHERWOOD, J.S.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L.K. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**, v.46, p.342-352, 2002.

JOHNSON, T.J.; JOHNSON, S.J.; NOLAN, L.K., Complete DNA Sequence of a ColBM Plasmid from Avian Pathogenic *Escherichia coli* Suggests that It Evolved from Closely Related ColV Virulence Plasmids. **Journal of Bacteriology**. v.188, n.16, p.5975–5983, 2006.

JOHNSON, T.J.; KARIYAWASAM, S.; WANNEMUEHLER, Y.; MANGIAMELE, P.; JOHNSON, S.J.; DOETKOTT, C.; SKYBERG, J.A., LYNNE, AM, JOHNSON, J.R.; NOLAN, L.K. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.3228-3236, 2007.

KARIYAWASAM, S.; WILKIE, B.N.; GYLES, C.L. Resistance of broiler chickens to *Escherichia coli* respiratory tract infection induced by passively transferred egg-yolk antibodies. **Veterinary Microbiology**, n. 98, p.273–284, 2004.

LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J.; Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia-Review article. **Research in Veterinary Science**, n.73, p.27–35, 2002.

LARSSON, A.; CARLANDER, D. AND WILHELMSSON, M. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. **Food and Agricultural Immunology**, v.10, p.29–36, 1998.

LEE, E.N.; SUNWOO, H.H.; MENNINEN, K. e SIM, J.S. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibodies (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**, v.81, p. 632-641, 2002.

LYNNE, A.M.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L.K. Immune response to recombinant *Escherichia coli* Iss protein in poultry. **Avian Diseases**, v.50, p.273-276, 2006a.

LYNNE, A.M.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L.K. Characterization of monoclonal antibodies to avian *Escherichia coli* Iss. **Avian Diseases**, v.50, p.445-449, 2006b.

LYNNE, A.M.; SKYBERG, J.A.; LOGUE, C.M.; NOLAN, L.K. Detection of Iss and Bor on the surface of *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.660-666, 2007.

MINHARRO, S.; LINHARES, G.F.C.; ANDRADE, M.A.; ROCHA, P.T.; SANTANA, A.P. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v.2, n.2, p.111-117, 2001.

MOURA, A.C.; IRINO, K.; VIDOTTO, M.C., Genetic Variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. **Avian Diseases**. v.45, p.73-81, 2001.

NOLAN, L; HORNE, S.M., GIDDINGS, C.W., FOLEY, S.L.; JOHNSON, T.J., LYNNE, A.M. Resistance to serum complement, iss, and virulence of Avian *Escherichia coli*, Review article, **Veterinary Research Communications**, v.27, p.101-110, 2003.

PEIGHAMBARI, S.M.; JULIAN, R.L. e GYLES, C.L. Experimental *Escherichia coli* respiratory infection in broilers. **Avian Diseases**, v.44, p.759-769, 2000.

PERKONEM, S. e FILE, J. A rapid turbidimetric assay for the study of serum sensitivity of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**. v.42, p.52-57, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning – A laboratory manual. 3 vols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

SKYBERG, J. A.; HORNE, S.M. ; GIDDINGS, C.W. ; WOOLEY, R.E.; GIBBS, P.S. E NOLAN, L.K. Characterizing Avian *Escherichia coli* Isolates with Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Avian Diseases**, v.47, n.4, p.1441–1447, 2003.

TINI, M., JEWELL, U.R., CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMAN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.131, p.569–574, 2002.

TYLER, C.D.; LICHTI, C.F.; DIEKMAN, A.B.; FOLEY, S.L. Evaluation of Differentially Expressed Proteins Following Serum Exposure in Avian Pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.52, p.23-27, 2008.

VIDOTTO, M.C.; MÜLLER, E.E.; de FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.A.; GUIMARÃES, I.G. AND SANTOS, D.S. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.34, p.531-538, 1990.

WOLLEY, R.E.; SPEARS, K.R.; BROWN, J.; NOLAN, L.K.; FLETCHET, O.J. Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, n.36, p.679-684, 1992.

YAGUCHI, K., OGITANI, A.C.T, OSAWA, A R., KAWANO, B.M., KOKUMA, B. N. I, KANESHIGE, A.T., NORO, A T., MASUBUCHI, A.K., e SHIMIZU, Y. Virulence Factors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Chickens with Colisepticemia in Japan, **Avian Diseases**, n. 51, p.656–662, 2007.

YU-HONG Z.; LI-JI J.; JIE GUO; XIAO-YU LI; YA-NAN LU; JIE CHEN; YONG-PING XU. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 130, p.126–133, 2008.

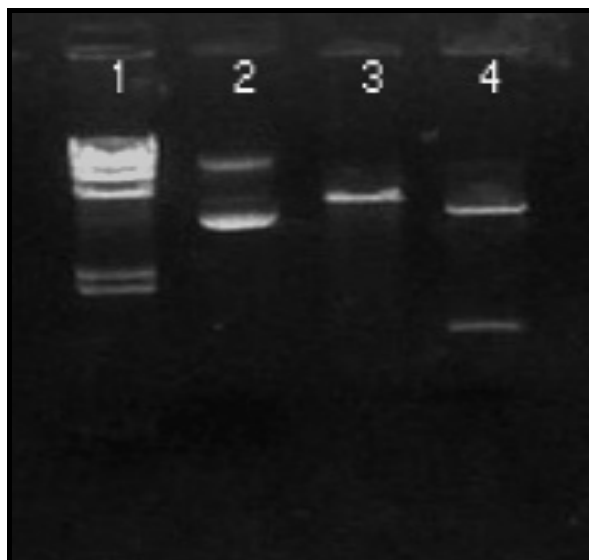


Figura 1. Clivagem pET30/*iss* com as enzimas de restrição Hind III e SmaI. 1- marcador molecular; 2- pET30/*iss* sem clivar; 3- pET30/*iss* clivado com Hind III; 4- pET30/*iss* clivado com SmaI.

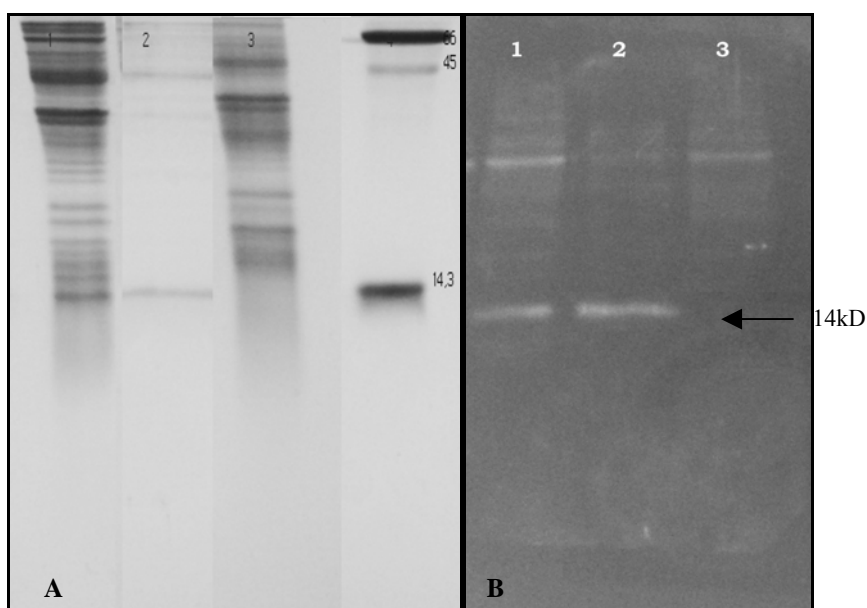


Figura 2. Expressão e resposta imunológica da proteína rIss em galinhas poedeiras. (A) SDS-PAGE 15% corado com Comassie brilliant blue. (B) Western blot com IgY anti-rIss e anti-chicken IgY conjugado com peroxidase. Linha 1. BL21/pET30-*iss* induzida com IPTG 1mM; linha 2- rISS eluída; linha 3 - *E. coli* BL21; linha 4- Massa molecular. A banda de aproximadamente 14kDa corresponde a proteína Iss recombinante.

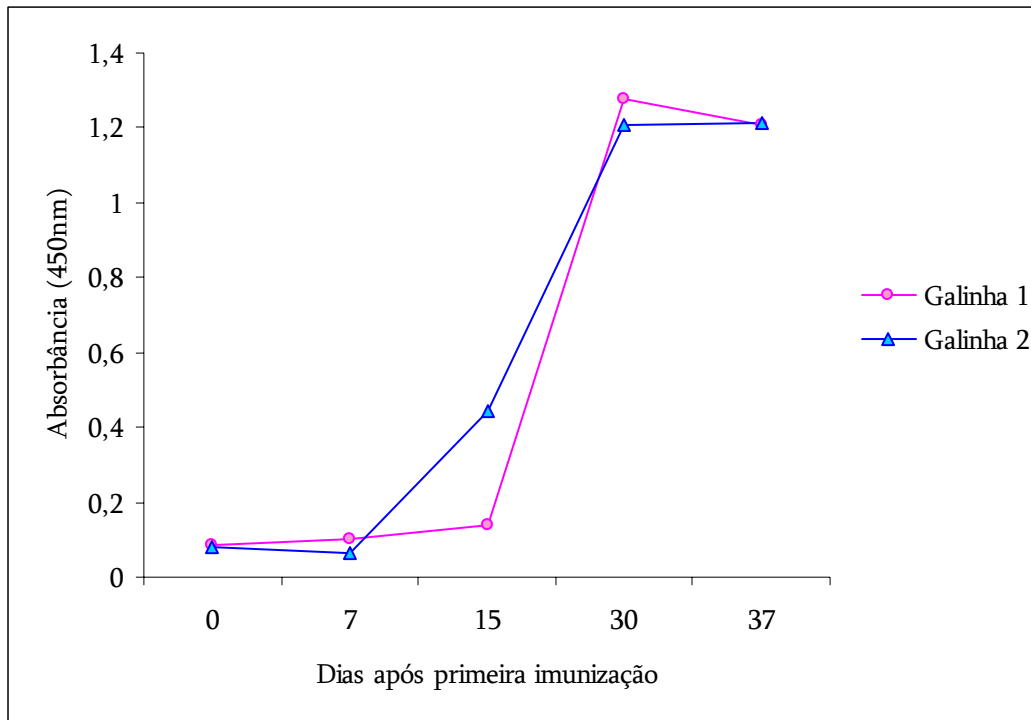


Figura 3. Teste de ELISA demonstrando o aumento dos níveis de IgY anti-rISS, após as imunizações das aves com a proteína recombinante ISS. (Dia 0= 1ª imunização)

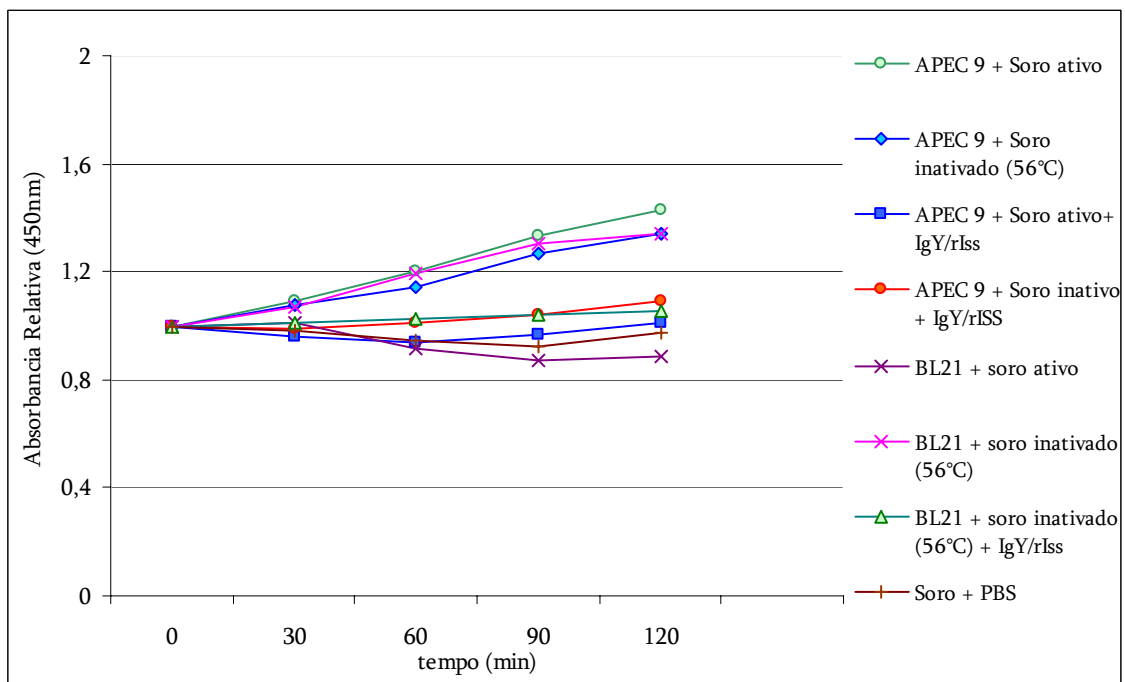


Figura 4. Curva do ensaio de resistência sérica e inibição da atividade sérica das amostras bacterianas APEC9 e BL21, incubadas com soro de galinha e IgY anti-rISS a 37°C.

4 CONCLUSÕES

- O gene *iss* clonado da amostra APEC9 apresentou 100% de similaridade com o tipo 1 descrito na literatura.
- A expressão da proteína de baixo peso molecular no vetor pET SUMO direcionou a resposta imune humoral (IgY) contra a sequência SUMO e não somente contra a proteína desejada, no entanto a proteína ISS recombinante (rISS) expressa no vetor pET 30 foi capaz de induzir a formação de IgY anti-rISS em galinhas poedeiras.
- Os anticorpos da classe IgY anti-rISS foram capazes de inibir o crescimento bacteriano na presença de soro.
- A administração de IgY anti-rISS por via intramuscular em pintainhos foi capaz de diminuir as lesões após o desafio com APEC9.

APÊNDICES

APÊNDICE A
SOLUÇÕES E TAMPÕES

APÊNDICE A – Soluções e Tampões

- **Tampão de sensibilização (0,05 M Carbonato/Bicarbonato pH 9,6)**

Na ₂ CO ₃	1,59 g
Na H ₂ O	2,93 g
HCO ₃	2,93 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 ml

- **Tampão de bloqueio**

Tampão de sensibilização + 5% de leite em pó desnatado

- **PBS-Tween 20**

NaCl	8,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 ml
pH	7,4

- **Substrato cromógeno**

Tampão substrato	10 ml
TMBZ	100 µl
H ₂ O ₂ PA 30%	100 µl

- **Soluções para purificação em condições desnaturantes**

1. **Tampão de lise pH 8,0**

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,80 g
10 mM Tris-Cl	1,20g
6 M GuHCl (guanidina)	573,00 g
H ₂ O destilada q.s.p	1000 ml
Ajustar pH usando NaOH	

2. **Tampão de lavagem pH 8,0**

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,80 g
10 mM Tris-Cl	1,20g
8 M NH ₃ (uréia)	480,00 g
H ₂ O destilada q.s.p	1000 ml

3. **Tampão de lavagem pH 6,3**

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,80 g
10 mM Tris-Cl	1,20g
8 M NH ₃ (uréia)	480,00 g
H ₂ O destilada q.s.p	1000 ml
Ajustar pH com HCl	

4. Tampão de lavagem pH 5,9

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,80 g
10 mM Tris-Cl	1,20g
8 M NH ₃ (uréia)	480,00 g
H ₂ O destilada q.s.p	1000 ml
Ajustar pH com HCl	

5. Tampão de eluição pH 4,5

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,80 g
10 mM Tris-Cl	1,20g
8 M NH ₃ (uréia)	480,00 g
H ₂ O destilada q.s.p	1000 ml
Ajustar pH com HCl	

6. Tampão de eluição pH 4,0

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,80 g
10 mM Tris-Cl	1,20g
8 M NH ₃ (uréia)	480,00 g
H ₂ O destilada q.s.p	1000 ml
Ajustar pH com HCl	

7. Acrilamida

N, N' Metileno-bis-acrilamida	1 g
Acrilamida	29 g
H ₂ O destilada q.s.p	100 ml

8. Lower TRIS/SDS 1,5M pH 8,8

TRIS base	18,165g
SDS	0,4 g
H ₂ O destilada q.s.p	100 ml

9. Upper TRIS/SDS 0,5M pH 6,8

TRIS base	6,055 g
SDS	0,4 g
H ₂ O destilada	100 ml

APÊNDICE B
PROTOCOLO DE TÉCNICAS

APÊNDICE B – Protocolo de Técnicas

• **Protocolo de Transformação da *E. coli* BL21 Star (DE3) One the Shot**

1. Descongele no gelo, a BL21 Star (DE3) One Shot competente para a transformação
2. Adicione 5-10 ng do DNA em um volume de 1 a 5 μ l em BL21 (DE3) e misture delicadamente com o pipetador
3. Incubar no gelo por 30 min
4. Incubar em banho maria 45s a 42°C sem agitar
5. Transferir imediatamente os tubos para o gelo
6. Adicione 250 μ l de meio SOC à temperatura ambiente
7. Feche o tubo firmemente, prenda os tubos em seus lugares (para maior aeração) e incube a 37°C por 30 min sob agitação
8. Adicione 150 μ l de transformação em 10 ml de meio LB contendo antibiótico apropriado (canamicina 30 μ g/ml)
9. Crescer “overnight”, 37°C com agitação
10. Adicionar 100 μ l da transformação em placa de LB ágar com antibiótico (canamicina 30 μ g/ml) e plaquear com alça de drigalsky

• **Indução da Expressão da Proteína Recombinante**

1. A partir do pré-inóculo (10 ml de LB crescido “overnight” com 30 μ g de canamicina, preparar a seguinte diluição: 100 μ l de pré-inóculo para 1 ml de meio LB contendo antibiótico apropriado)
2. Incubar a 37°C, com agitação de 200rpm, por aproximadamente 2-3hs
3. Verificar a D.O.600nm entre 0,5 - 0,8 (ideal entre 0,5 - 0,6)
4. Adicionar IPTG para induzir a expressão da proteína recombinante para uma concentração final de 1 mM (solução estoque de IPTG 1 M)
5. Incubar a 37°C, com agitação de 150 rpm, por 4h

• **Produção e Expressão da Proteína**

1. Crescer bactéria BL21(DE3) em 10 ml de LB caldo (contendo 30 μ g/ml de canamicina), 37°C, *overnight*, sob agitação
2. No dia seguinte, semear o pré-inóculo (10 ml) em 100 ml de LB caldo (30 μ g/ml de canamicina), 37°C, sob agitação 200rpm, por aproximadamente 3 h
3. Verificar a D.O.600nm entre 0,5 - 0,8 (ideal entre 0,5 - 0,6)
4. Adicionar IPTG para induzir a expressão da proteína recombinante para uma concentração final de 1 mM
5. Incubar a 37°C, com agitação de 150 rpm, por 4h.
6. Centrifugar durante 5 min, 5000 rpm a 4°C
7. Desprezar o sobrenadante
8. Ressuspender o precipitado em PBS, distribuir em microtubos e centrifugar novamente por 3 min à 13.000 rpm
9. Descartar sobrenadante e congelar o precipitado a -20°C até o momento da purificação de proteína

- **Preparo de Lisado de *E. coli* BL21 em Condições Desnaturantes (Qiagen)**
 1. Retirar o precipitado do congelador e ressuspender em tampão de lise (16 ml de tampão para precipitado referente a 50 ml de cultura) e deixar homogeneizando por 1 hora em banho de gelo
 2. Adicionar lizosima (1 mg/ml) e reincubar por 15 min no gelo
 3. Sonicar no gelo, 10 pulsos de 10s a 200 - 300 W
 4. Acrescentar 50µl de PMSF ([44 mM])
 5. Centrifugar o lisado a 10.000 rpm por 20 min a 4 °C
 6. Transferir o sobrenadante para a coluna de níquel, para iniciar a purificação da proteína

- **Purificação de Proteína de *E.Coli* em Condições Desnaturantes (Qiagen)**
 1. Ligar o lisado por 1h sob agitação em gelo
 2. Remova o conteúdo e adicione 5ml de tampão de lavagem pH 8,0, homogeneizar por 10 min
 3. Remova o conteúdo e adicione 5ml de tampão de lavagem pH 6,3, homogeneizar por 10 min
 4. Repetir mais uma vez este procedimento ítem 3
 5. Remova o conteúdo e adicione 5ml de tampão de lavagem pH 5,9, homogeneizar por 10 min
 6. Repetir duas vezes o procedimento do ítem 5
 7. Remova o conteúdo e adicione 500µl de tampão de eluição pH 4,5 homogeneizar por 10 min
 8. Repetir duas vezes o procedimento do ítem 7
 9. Remova o conteúdo e adicione 500µl de tampão de eluição pH 4,0 homogeneizar por 10 min
 10. Repetir duas vezes o procedimento do ítem 9
 11. Armazenar a proteína eluída a -20°C até o uso.

- **Protocolo da Técnica de Western Blotting**
 1. Correr gel SDS-PAGE e colocar para transferir as proteínas para a membrana de nitrocelulose *overnight*
 2. Retirar a membrana de nitrocelulose do tampão de transferência
 3. Bloquear a membrana com tampão de bloqueio (solução PBS+ 0,1% Tween 20+ leite desnatado 5%) por 1 h, sob agitação
 4. Incubar a membrana com o anticorpo IgY-rIss (1:500) diluídos em tampão de bloqueio por 1 h
 5. Lavar a membrana em PBS-T 0,1% 5 vezes por 10min por uma hora
 6. Incubar com anticorpo secundário (anti-*chicken*), na proporção de 1:10,000 por 1h
 7. Lavar 5 vezes por 5 min
 8. Revelar a reação com kit de ECL (quimioluminescência) 1 ml de cada solução.

- **Purificação de IgY (AKITA e NAKAI, 1993) Modificado.**
 1. Separe a gema da clara (o máximo possível)
 2. Retire a película protetora da gema
 3. Fazer *pool* de 6 ovos (aproximadamente 80 mL)
 4. Diluir as gemas (1:5) com água destilada pH 2,5
 5. Homogeneizar bem e congelar à -20°C por 24 h.
 6. Descongelar lentamente a 4° C por 12 h
 7. Filtrar a solução com auxílio de papel filtro
 8. Adicionar 35% do volume de sulfato de amônio e agitar por 15 min
 9. Deixar em repouso por 1 h, temperatura ambiente
 10. Centrifugar 5000 rpm a 4° C por 15 min
 11. Ressuspender o precipitado em água destilada estéril (quantidade mínima suficiente para ressuspender o precipitado)
 12. Distribuir a solução em membrana para diálise
 13. Diálisar contra água por 24hs
 14. Diálisar contra PBS por 24 h
 15. Adicionar timerosal a 2% para se obter concentração final de 0,02%
 16. Armazenar a 4° C até o momento do uso.

- **Teste Imunoenzimático Indireto - ELISA**
 1. Sensibilizar as placas com 100 µl de solução de antígeno diluído em tampão de sensibilização (Tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6). Concentração do antígeno 1,5 µg/ml, por 18 h a 4°C.
 2. Lavar 3 vezes com 200 µl de PBS-Tween 20 0,05%.
 3. Bloquear a placa com 150 µl de PBS-Leite 5% e incubar por 1 h a 25°C.
 4. Lavar 3 vezes com 200 µl de PBS-Tween 20 0,05%.
 5. Testar a amostra desejada aplicando 100 µl da solução (soro ou gema) diluída em PBS-Leite 1% e incubar por 1 h a 25° C.
 6. Lavar 3 vezes com 200 µl de PBS-Tween 20 0,05%.
 7. Adicionar 100 µl de conjugado anti-chicken peroxidase diluído (1:10,000) em PBS-Leite 1% e incubar durante 1h a 25 °C.
 8. Lavar 3 vezes com 200 µl de PBS-Tween 20 0,05%.
 9. Adicionar 100 µl de Tampão substrato cromógeno incubar 15 min a 25° C, embrulhado em papel alumínio.
 10. Adicionar 50 µl de 1 NH₂SO₄Cl.
 11. Realizar a leitura em espectrofotômetro com filtro de 490nm.