

Claudia de Oliveira Ayala

Sorologia de antígenos flagelares de amostras de *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* produtoras da Toxina de Shiga (STEC) isoladas de diferentes animais e análise comparativa do gene *fliC* por PCR-RFLP

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

São Paulo

2009

Claudia de Oliveira Ayala

Sorologia de antígenos flagelares de amostras de *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* produtoras da Toxina de Shiga (STEC) isoladas de diferentes animais e análise comparativa do gene *fliC* por PCR-RFLP

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de atuação: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ayala, Claudia de Oliveira.

Sorologia de antígenos flagelares de amostras de *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (STEC) isoladas de diferentes animais e análise comparativa do gene *fliC* por PCR-RFLP / Claudia de Oliveira Ayala. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Antonio Fernando Pestana de Castro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bacteriologia médica e veterinária.

Versão do título para o inglês: Serology of flagellar antigens from strains of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) isolated from different animals and comparative analysis of the *fliC* gene by PCR-RFLP.

Descritores: 1. *Escherichia coli* 2. Reação em Cadeia por Polimerase (PCR) 3. Flagelina 4. *FliC* 5. RFLP I. Pestana de Castro, Antonio Fernando II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0146/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Claudia de Oliveira Ayala.

Título da Tese: Sorologia de antígenos flagelares de amostras de *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (STEC) isoladas de diferentes animais e análise comparativa do gene *fliC* por PCR-RFLP.

Orientador(a): Antonio Fernando Pestana de Castro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Dedico essa Tese à minha mãe Luci, meu pai Vicente, e meus irmãos Euclides e  
Leonardo: obrigada por me ajudarem a chegar até aqui.  
Dedico também ao meu marido Fernando: seu amor e apoio incondicionais durante  
esta caminhada me ensinaram a acreditar em meu potencial.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar vida, oportunidades e me prover dos recursos necessários para viver todos os dias;

Agradeço ao Professor Pestana, por ter me aceito como sua orientada no programa de Pós-Graduação e pelos ensinamentos transmitidos;

Aos Professores Rita de Cássia, Waldir Elias, Aloysio Cerqueira, Antonio Carlos Pignatari e Beatriz Guth por suas sugestões e correções em minha qualificação;

À Ylanna Kelner Burgos, minha “amiga-irmã”, por todas as horas de aprendizado e diversão dentro e fora do laboratório. Obrigada por acreditar em mim e fazer parte de minha vida;

À minha amiga Lika, por todos os momentos divertidos e as dificuldades que enfrentamos juntas no laboratório;

Aos meus amigos Priscilla, Monika e Haroldo, que estão sempre ao meu lado, independente da distância;

Às meninas que já passaram pelo laboratório: Eliana e Luciana, pela boa companhia durante muitas horas de pesquisa;

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido durante os cinco anos de pesquisa;

À Alice, por toda a sua ajuda acadêmica e sábios conselhos durante os 5 anos: muito obrigada;

Às meninas da secretaria do ICB II, Aninha e Naíde, por terem me auxiliado em todos os momentos que precisei;

À equipe da Biblioteca: Maria José e Eva, pela ajuda na fase de conclusão da tese;

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para que eu concluísse meu trabalho: muito obrigada!

## RESUMO

AYALA, C.O. **Sorologia de antígenos flagelares de amostras de *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* produtoras da Toxina de Shiga (STEC) isoladas de diferentes animais e análise comparativa do gene *fliC* por PCR-RFLP.** 2009. 62 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A espécie *Escherichia coli* constitui um grupo de bactérias tipicamente não patogênicas e que fazem parte do trato intestinal de humanos e animais. As amostras são sorotipadas com base em seus antígenos de superfície O (somático), H (flagelar) e K (capsular). O antígeno flagelar correspondente ao filamento é formado pela polimerização da flagelina, codificada pelo gene *fliC*. O presente trabalho empregou a técnica de PCR-RFLP para analisar os padrões de antígenos flagelares de 112 amostras de EPEC e STEC. Quatorze amostras não amplificaram o gene *fliC*, 17 tiveram seu antígeno flagelar determinado apenas por PCR-RFLP e 75 amostras tiveram seus antígenos flagelares confirmados por esta técnica. Três antígenos H com padrões irregulares foram clonados e sequenciados. Após o sequenciamento, inserções e remoções de nucleotídeos foram encontradas. Até o momento, poucos estudos utilizam um número abrangente de amostras de STEC e EPEC provenientes de diferentes animais para a determinação do antígeno H empregando a técnica de PCR-RFLP do gene *fliC*. De acordo com os resultados encontrados neste estudo, podemos concluir que a técnica de PCR-RFLP do gene *fliC* é mais rápida, menos trabalhosa e mais eficiente que a metodologia de sorotipagem clássica.

**Palavras-Chave:** *Escherichia coli*. Amostras animais. Antígeno flagelar. Gene *fliC*. Técnica de PCR-RFLP.

## ABSTRACT

AYALA, C.O. **Serology of flagellar antigens from strains of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) isolated from different animals and comparative analysis of the *fliC* gene by PCR-RFLP.** 2009. 62 P. Thesis (Ph. D. Thesis in Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The *Escherichia coli* species consists of a group of typically non-pathogenic bacteria present in the intestinal tract of humans and animals. Strains are serotyped according to their O (somatic), H (flagellar) and K (capsular) surface antigens, in order to distinguish these microorganisms from the non-pathogenic members of the intestinal microbiota. The flagellar antigen corresponding to the filament is formed by the polymerization of the flagellin, codified by the *fliC* gene. This study employed the PCR-RFLP technique to analyze flagellar antigen patterns from 112 EPEC and STEC strains. Fourteen strains have not amplified the *fliC* gene, 17 had their flagellar antigen determined only by the PCR-RFLP and 75 strains had their flagellar antigen confirmed by this technique. Three H antigens with irregular patterns were cloned and sequenced. After sequencing, insertions and deletions of nucleotides were discovered. So far, few studies used a significant number of STEC and EPEC strains originated from different animals to determine H antigens employing the PCR-RFLP technique of the *fliC* gene. According to the findings of this study, we assumed that PCR-RFLP of the *fliC* gene is faster, less laborious and more efficient than classic serotyping methodology.

**Keywords:** *Escherichia coli*. Animal strains. Flagellar antigen. *fliC* gene. PCR-RFLP technique.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Reação de PCR para o gene <i>fliC</i> das amostras isoladas de ovinos	30
Figura 2- PCR do gene <i>fliC</i> de amostras isoladas de diferentes animais com antígeno flagelar imóvel	31
Figura 3- RFLP das amostras isoladas de ovinos	37
Figura 4- RFLP das amostras de cães, bovinos e coelhos	38
Figura 5- RFLP de amostras isoladas de diferentes animais que amplificaram o gene <i>fliC</i> , mas que apresentaram perfil anômalo após digestão com a enzima <i>Rsa</i> I	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Amostras padrão utilizadas	21
Tabela 2- Iniciadores, temperatura de anelamento da PCR e tamanho dos amplicons para os genes que codificam fatores de virulência	23
Tabela 3- Iniciadores utilizados para amplificar o gene <i>fliC</i> , temperatura de anelamento e tamanho do amplicon	24
Tabela 4- Amostras utilizadas no presente estudo, sorologia, resultados de PCR para os genes <i>eae</i> e <i>stx</i> e determinação do antígeno H por PCR-RFLP	35

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

