

Naíta Roman Bohn, Nicolle Lima Barbieri e Fabiana Horn

Laboratório de Microbiologia Celular - Departamento de Biofísica - Instituto de Biociências - UFRGS

INTRODUÇÃO

As cepas de *Escherichia coli* patogênicas aviárias (APEC) são responsáveis por infecções principalmente extra-intestinais em aves. Elas causam grandes prejuízos econômicos na indústria aviária devido ao comprometimento da ave e seus produtos. Os fatores determinantes de virulência de APEC vêm sendo estudados, na tentativa de identificar o que caracteriza essas cepas e de elucidar seus mecanismos de patogênese e de interação com o hospedeiro.

Os sistemas de secreção tipo III (T3SS) são importantes fatores de virulência em bactérias Gram-negativas enteropatogênicas. Eles são compostos por diversas proteínas que formam um complexo em forma de agulha (Fig. 1), que permite a secreção de proteínas efetoras diretamente no citoplasma das células hospedeiras, onde modulam funções bioquímicas e expressão gênica.

O objetivo desse trabalho é avaliar por PCR a presença de 4 genes conservados do T3SS (*escC*, *escJ*, *escN* e *escV*) em cepas APEC provenientes do Rio Grande do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi feita uma busca no banco de dados do National Center for Biotechnology (NCBI) para os genes *escC*, *escJ*, *escN* e *escV* (Fig. 2) no genoma sequenciado de APEC (APEC O1) e também nos plasmídeos sequenciados de APEC.

Oligonucleotídeos iniciadores para os genes *escC*, *escJ*, *escN* e para duas porções diferentes do gene *escV* foram testados por PCR *in silico* através dos programas Vector NTI versão 10.3 e pDRAW32. Para controles positivos foram utilizados genomas de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e para controle negativo, *E. coli* K-12.

As cepas APEC do RS foram obtidas no período de setembro de 2007 a janeiro de 2008, isoladas de frangos de corte com colissepse em abatedouros. A extração do DNA para PCR foi feita através do método da simples fervura: uma alçada de cultura bacteriana foi suspensa em água Milli-Q, incubada a -20° C por 10 min, depois a 100° C por 10 min, seguida de centrifugação a 14000 g por 10 min.

Foi feita PCR dos genes *escV* e *escC* para as amostras do RS segundo as seguintes condições: 94° C por 3 min, 25 ciclos de 94° C por 30 segundos, 50-54° C por 30 segundos, 72° C por 1 min e 72° C por 10 min. Foi utilizada uma cepa EPEC como controle positivo e K-12 como negativo. O resultado foi lido em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

RESULTADOS

Não foram encontrados os genes do T3SS nos genomas de APEC sequenciados (1 cromossomo e 7 plasmídeos) disponíveis no banco de dados do NCBI.

Na PCR *in silico*, foram amplificados fragmentos de tamanho próximo ao esperado para a maioria dos controles positivos, com exceção de EHEC O103:H2, que não amplificou *escC* e uma das porções do *escV*, pois diferia em alguns pares de bases no sítio de anelamento dos iniciadores (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado da PCR *in silico*. Tamanho dos fragmentos amplificados, em pares de bases, para os controles positivos EHEC O103:H2, EHEC O157:H7 e EPEC O127:H6 e para o controle negativo K-12, comparados ao tamanho esperado.

Gene	Esperado	EHEC O103H2	EHEC O157H7	EPEC O127H6	K-12
<i>escC</i>	449	-	447	447	-
<i>escJ</i>	337	335	335	335	-
<i>escN</i>	856	854	854	854	-
<i>escV</i>	758	-	756	756	-
<i>escV</i>	155	155	155	155	-

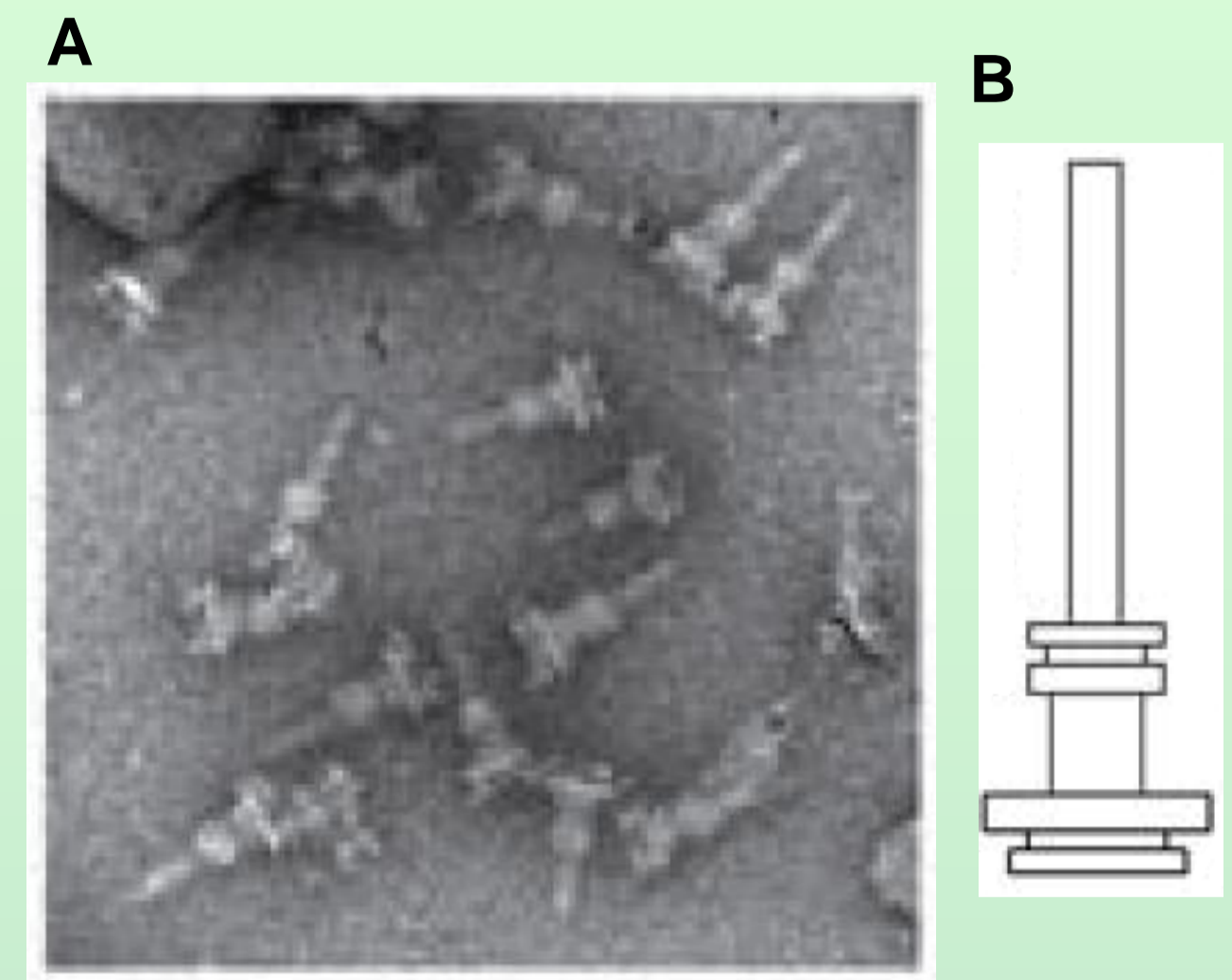


Figura 1. (A) Eletromicrografia do complexo em forma de agulha. (B) Desenho esquemático do complexo (Fonte: Marlovitz *et al.*, 2004).

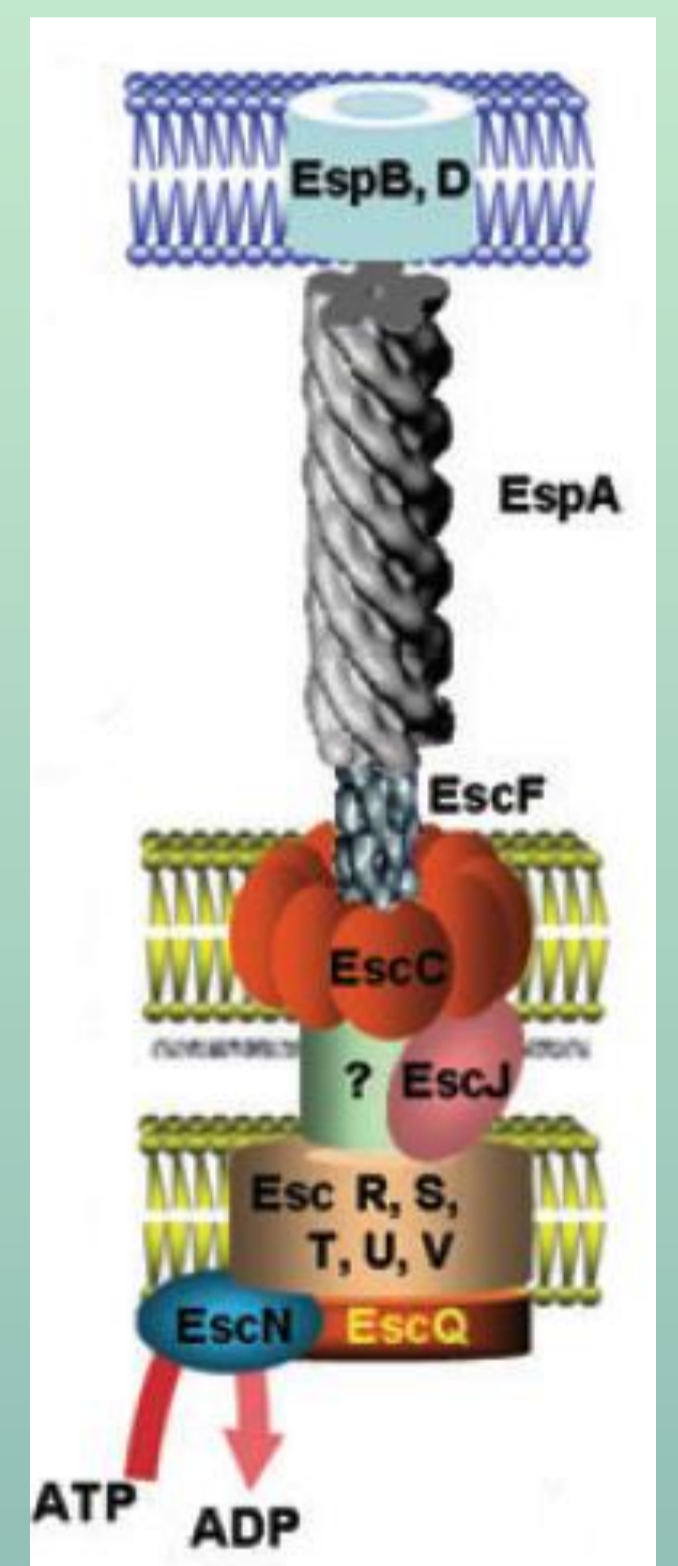


Figura 2. Esquema do T3SS, mostrando os genes testados (Fonte: Tampakaki *et al.*, 2004).

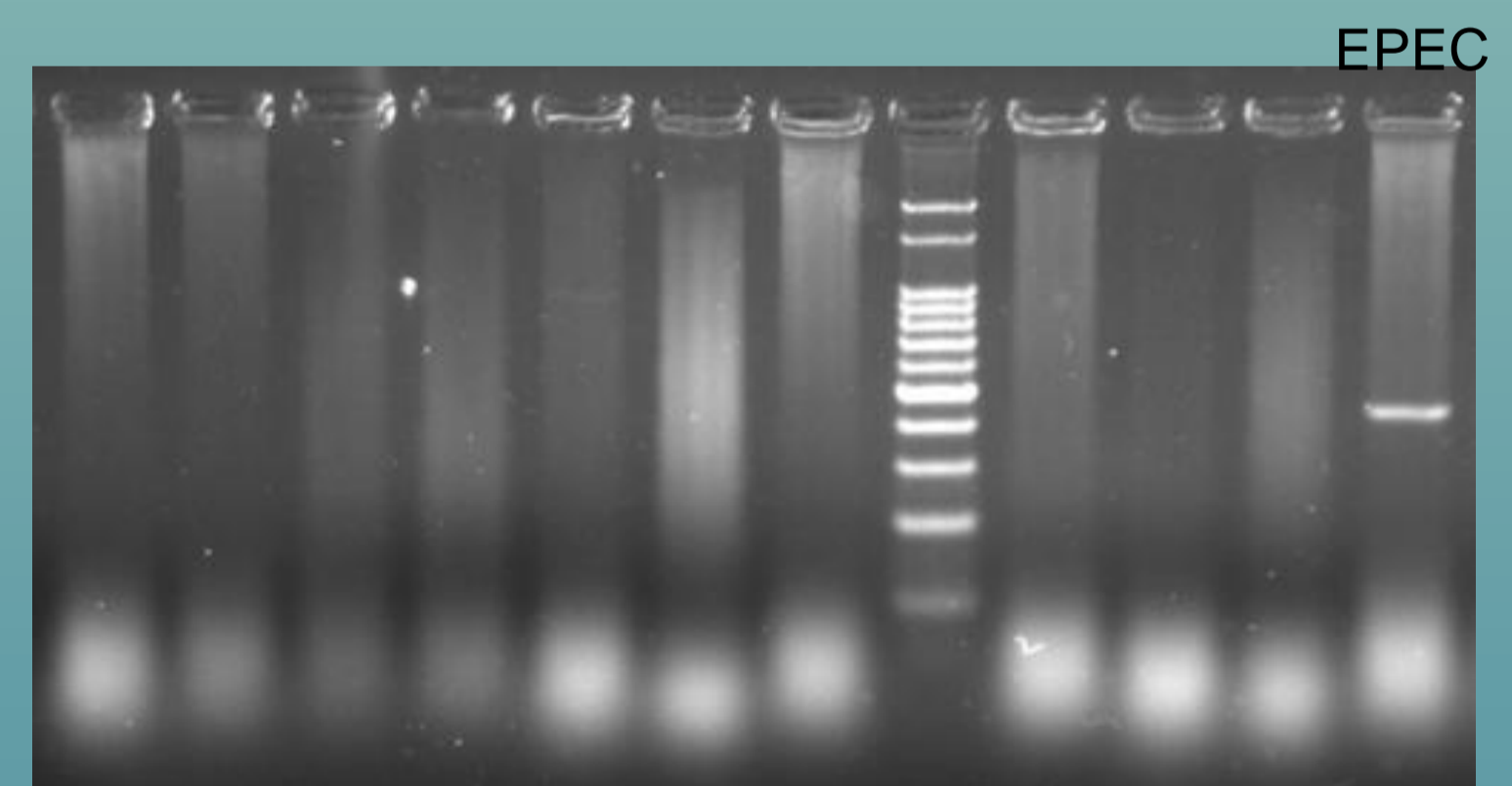


Figura 3. Gel mostrando fragmento amplificado do gene *escC* (449 pb) para o controle positivo EPEC.

Foram analisadas 46 amostras de APEC do RS por PCR para presença do gene *escV* (porção de 155 pb), das quais 18 (39%) amplificaram fragmento de tamanho esperado. Para o gene *escC*, foram analisadas 57 amostras do RS, sendo que nenhuma foi positiva.

DISCUSSÃO

Somente uma cepa APEC possui genoma sequenciado. O fato desta não apresentar T3SS não significa que outras cepas APEC não apresentem. Já os dados de PCR do gene *escC* para as amostras do RS sugerem que essas cepas não possuem o T3SS.

A PCR da porção testada do gene *escV* (155 pb) pode estar amplificando fragmentos inespecíficos; assim os dados serão verificados através da amplificação de outra porção deste gene com um segundo par de iniciadores. Além disso, as amostras do RS serão testadas para os genes *escJ* e *escN*.

BIBLIOGRAFIA

Marlovits, TC.; Kubori, T.; Sukhan, A.; Thomas, DR.; Galán, JE.; Unger, VM. (2004). Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*. 306(5698):1040-2.

Tampakaki A.P.; Fadouloglou V.E.; Gazi A.D.; Panopoulos N.J.; Kokkinidis M. (2004). Conserved features of type III secretion. *Cellular microbiology* 6(9):805.