

Débora A. Rocha e Fabiana Horn.

Departamento de Biofísica – Instituto de Biociências – UFRGS

INTRODUÇÃO

Escherichia coli patogênicas aviárias (APEC) são causadoras de infecções extra-intestinais, denominadas colibacilose, em aves domésticas e selvagens. Entre os genes associados à virulência de APEC estão os genes *iron*, *iutA*, *iss*, *ompT* e *hlyF*, propostos por Johnson *et. al.* (J.Clin.Microbiol., 2008, 46:3987) como marcadores de virulência dessas cepas. A fim de validar a PCR Pentaplex como uma possível ferramenta de diagnóstico de APEC para as cepas brasileiras, testamos a PCR pentaplex em 193 isolados APEC, obtidos de frangos com celulite ou colissepticemia, e 100 isolados de *E. coli* ambientais coletadas da cama de aviários, da região sul do Brasil. Todos os isolados foram testados *in vivo* em pintos de um dia e a eles foi atribuído um índice de patogenicidade (PS – Pathogenicity Score).

RESULTADOS

Neste trabalho, realizamos a triagem dos genes que compõem a PCR pentaplex em 293 isolados. A Figura 1 apresenta um gel de eletroforese representativo dos produtos da PCR pentaplex. Analisando os resultados, verificamos que os genes *hlyF* e *ompT* estiveram sempre presentes nas mesmas amostras, por isso foram considerados como apenas um nas análises estatísticas. A Figura 2 apresenta a proporção de amostras patogênicas e ambientais contendo 0, 1, 2, 3 e 4 genes. A Figura 3 mostra a comparação entre a frequência dos genes nas amostras patogênicas e ambientais.

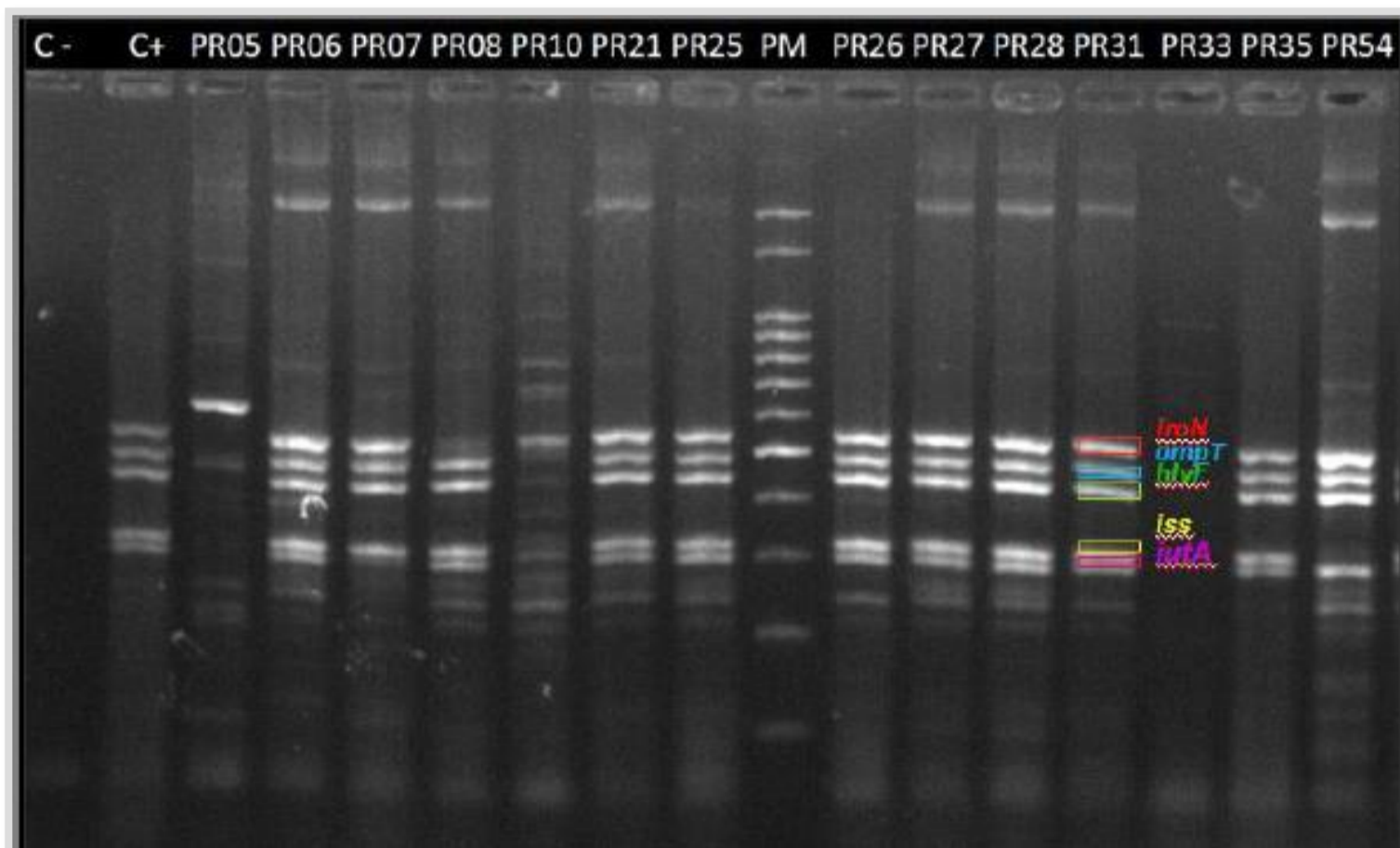


Figura 1. Gel de eletroforese dos produtos da PCR pentaplex: *iron*, (553 pb), *ompT* (496 pb), *hlyF* (450 pb), *iss* (323 pb) e *iutA* (302 pb). C-, controle negativo (água); C+, controle positivo, cepa APEC MT78; PM, marcador de tamanho molecular de 100 pares de bases.

Todas as reações de PCR foram realizadas em 21 µl contendo 2,5 µl 10x tampão PCR, 2,0 µl 50 mM MgCl₂, 2,5 U Taq DNA polimerase (CENBIOT), 0,6 µl 10 mM de cada dNTP, 0,2 µl (100 pmol) de cada par de oligonucleotídeo iniciador e 4 µl (40 ng) DNA da amostra. As reações foram submetidas nas seguintes condições em um termociclador: 25 ciclos de 2,5 minutos a 94 ° C, 30 segundos a 63 ° C, 2 minutos a 68 ° C e um ciclo final de 10 minutos a 72 ° C e posteriormente mantidos a 4 ° C até o processamento da amostra.

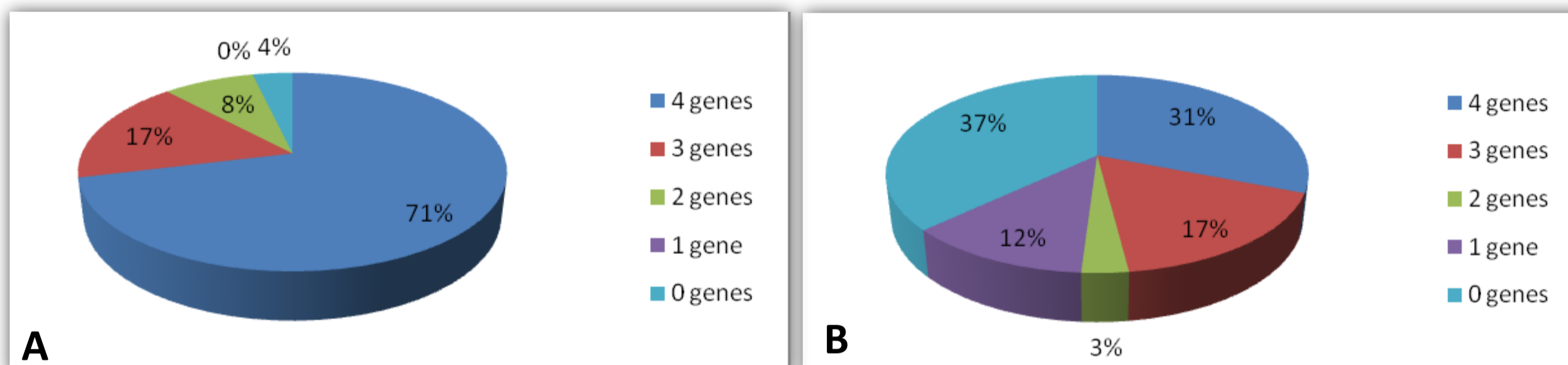


Figura 2. A, proporção de amostras patogênicas apresentando 0, 1, 2, 3 e 4 genes; **B,** proporção de amostras ambientais apresentando 0, 1, 2, 3 e 4 genes.

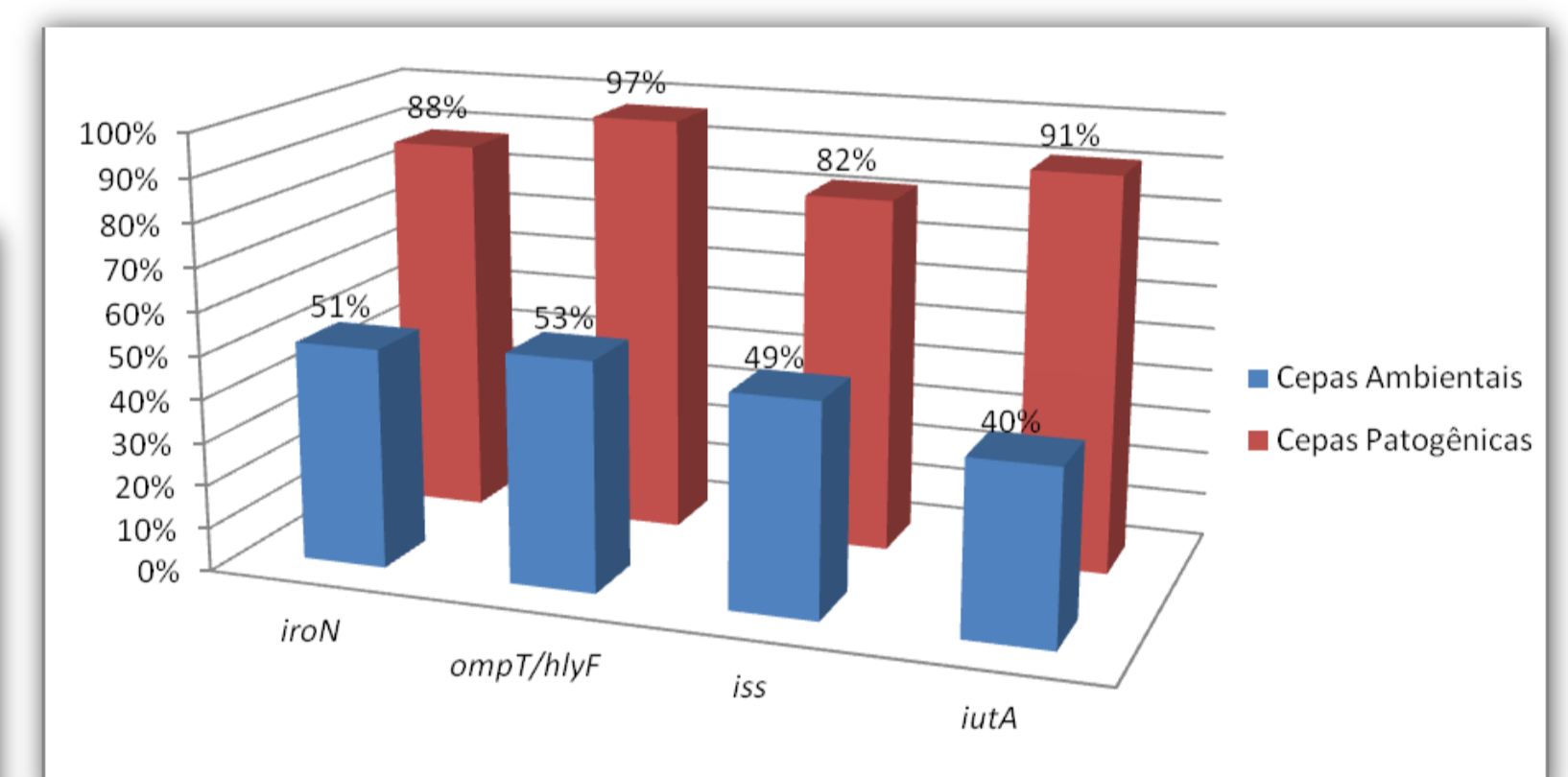


Figura 3. Comparação entre as frequência dos genes nas amostras ambientais e patogênicas.

Análise Estatística

A Tabela 1 mostra a mediana do PS na presença e na ausência de cada gene, considerando os isolados ambientais e patogênicos. A partir deste resultado, pode-se concluir que a presença de cada gene aumenta o PS do isolado (Teste Wilcoxon-Mann-Whitney; $p < 0,001$). Utilizando o teste Kruskal-Wallis, verificamos uma diferença significativa entre a mediana do PS nos isolados contendo 0 e 1 gene, e nos isolados contendo 2, 3 e 4 genes. Assim, amostras com 0 e 1 gene (grupo A) tendem a ter um PS mais baixo, enquanto amostras com 2, 3 ou 4 genes (grupo B) tendem a ter um PS mais alto (Tabela 2). Ao aplicarmos essa classificação às amostras APEC e ambientais (Tabela 3), observamos que a probabilidade de uma amostra sabidamente patogênica ser classificada no grupo B (2-4 genes) é de 95% (sensibilidade), enquanto a probabilidade de uma amostra ambiental ser classificada no grupo A (0 e 1 gene) é de apenas 49% (especificidade).

Tabela 1. Relação entre o PS e a presença dos diferentes genes nas amostras.

	gene +		gene -	
	PS	nº isolados	PS	nº isolados
<i>iron</i>	6,93	216	1,1	77
<i>ompT</i>	6,93	236	1,1	57
<i>hlyF</i>	6,93	236	1,1	57
<i>iss</i>	6,79	206	1,1	87
<i>iutA</i>	7,0	208	1,1	85

Tabela 2. Divisão das amostras em dois grupos (A e B), de acordo com o número de genes e o PS.

Grupos	nº genes	nº amostras	PS
A	0	47	1,0
	1	12	1,1
B	2	16	7,3
	3	50	6,29
	4	168	6,9

Tabela 3. Correlação entre os grupo definidos na Tabela 2 e a origem das cepas.

	B	A	Total
Patogênicas	183	10	193
Ambientais	51	49	100

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a PCR Pentaplex é eficaz para classificar amostras patogênicas como tal, porém, não é capaz de confirmar que um isolado obtido de uma ave saudável não é patogênico.