

Víctor G. Maturana ¹, Tatiana Amabile de Campos, Fernanda de Pace ¹, Eliana Guedes Stehling, Wanderley Dias da Silveira ¹.

¹Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana - Departamento de Microbiologia e Imunologia - UNICAMP, Campinas, SP.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; flagelina; APEC; filogenia

Agência Financiadora: SAE/PIBIC

Introdução

A bactéria *Escherichia coli* contribui para a manutenção da fisiologia intestinal de muitos animais. Pode, entretanto, causar uma grande variedade de doenças dependendo da presença de genes de virulência e das condições ambientais e do sistema imunológico do organismo hospedeiro. As linhagens de *E. coli* associadas à patogenicidade em aves são coletivamente denominadas APEC ("avian pathogenic *Escherichia coli*"). Tais linhagens levam a grandes perdas econômicas na produção de aves domésticas para a alimentação devido à morbidade, mortalidade, queda na produção e condenação de carcaças infectadas. Buscam-se, assim, formas de prevenir e controlar as infecções nos animais por linhagens patogênicas de *E. coli* através de técnicas de higienização dos criadouros, vacinação, uso de drogas antimicrobianas, etc. Estes métodos, contudo, têm-se demonstrado apenas parcialmente eficientes, o que pode ser atribuído, em parte, à grande diversidade molecular existente dentro das linhagens APEC, uma vez que algumas destas podem apresentar características intrínsecas que lhes conferem proteção contra os métodos de controle empregados, como, por exemplo, genes de resistência a diferentes classes de antibióticos. É necessário, portanto, que as linhagens APEC sejam caracterizadas e as relações filogenéticas estabelecidas, possibilitando melhores métodos de controle e tratamento gerais ou específicos para a linhagem presente no hospedeiro.

Material e Métodos

O objetivo desse trabalho foi caracterizar linhagens APEC causadoras de diferentes quadros patológicos (onfalite, septicemia e síndrome da cabeça inchada) e estabelecer relações filogenéticas entre tais linhagens através do sequenciamento e comparação do gene codificador de flagelina, *fliC*. As relações filogenéticas foram também estabelecidas com outros agentes patogênicos (*Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis* e *Yersinia enterocolitica*). Foram utilizadas 49 amostras isoladas de aves comerciais apresentando sinais clínicos de doenças: septicemia (S; n = 24), síndrome da cabeça inchada (SHS; n = 14), onfalite (O; n = 11); além de aves sem sinais clínicos de qualquer das doenças citadas (Comensais - C - ; n = 30). Todas as linhagens foram armazenadas a -80°C em meio LB, contendo 15% de glicerol na concentração final. A linhagem K12 HB101 de *E. coli* foi utilizada como controle positivo para a presença do gene *fliC* nas reações de amplificação.

Fig. 1 Dendograma obtido através do alinhamento de todas as seqüências obtidas no trabalho pelo algoritmo UPGMA (MEGA 3.1 software).

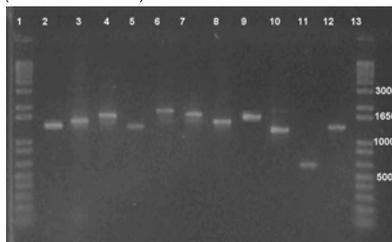


Fig. 2: Gel de agarose (1%) contendo os produtos do gene *fliC* das linhagens de *Escherichia coli* patogênicas de aves (APEC). 1: 1Kb "ladder" (bp); 2: linhagem C11; 3: linhagem C15; 4: linhagem C26; 5: linhagem S3; 6: linhagem C19; 7: linhagem C23; 8: linhagem S1; 9: linhagem S19; 10: linhagem S14; 11: linhagem SHS2; 12: linhagem SHS8; 13: 1Kb "ladder" (bp).

Resultados

O gene *fliC* foi detectado em 62 das 79 amostras empregadas no trabalho através de PCR. Os fragmentos amplificados variaram de 670 bp a 1900 bp (Figura 1). Aproximadamente 400 bp da região 5' do gene *fliC* e 500 bp da região 3' foram seqüenciadas. Todas as seqüências obtidas foram testadas através do BLAST e, após essa confirmação, as seqüências obtidas de APEC foram alinhadas, juntamente com 44 seqüências do gene *fliC* de *E. coli* humanas (antígeno-H), 9 serovars de *S. enterica* e com as seqüências de flagelina de *Y. enterocolitica* e *P. mirabilis*, obtendo-se como resultado o dendograma demonstrado na figura 1. É possível observar quatro grupos principais: 1, 1A, 1A.1 e 1A.2. O grupo 1 é composto por quatro linhagens, sendo duas de síndrome da cabeça inchada (SHS1 e SHS2), uma comensal (C1) e uma de onfalite (O6). O grupo 1A apresenta três linhagens comensais (C12, C21 e C9), uma de síndrome da cabeça inchada (SH3) e as espécies *P. mirabilis* e *Y. enterocolitica*. O grupo 1A.1 é composto por 12 linhagens comensais (C14, C7, C15, C5, C28, C29, C25, C8, C17, C4, C10, C22), duas de septicemia (S1 e S5), uma de onfalite (O8), seis seqüências de *E. coli* humana (H21, H11, H27, H16, H8, H2) e pelos nove serovars de *S. enterica*. O grupo 1A.3 é composto pelas 38 *E. coli* humanas restantes e pelas 38 linhagens APEC restantes, dentre as quais 8 linhagens comensais (C11, C18, C23, C13, C6, C26, C19, C3), 14 de casos de septicemia (S24, S19, S15, S23, S9, S8, S3, S22, S21, S13, S6, S14, S2, S4), 9 de casos de síndrome da cabeça inchada (SHS6, SHS8, SHS14, SHS13, SHS11, SHS12, SHS10 e SHS4), e 7 de casos de onfalite (O5, O4, O11, O3, O9, O7, e O2). O dendograma obtido (Figura 1) demonstrou a existência de dois grupos principais distintos: (1.A.2) composto em sua maior parte

por linhagens APEC (82%); e (1.A.1), composto em sua maior parte por linhagens comensais de *E. coli* aviárias. 38 linhagens de *E. coli* de origem humana também foram agrupadas em 1.A.2.

Discussão

A proximidade genética dos genes *fliC* de APEC e *E. coli* humanas sugere que o flagelo desses dois grupos possui ancestralidade comum, com a divergência na estrutura do filamento ocorrendo basicamente devido ao acúmulo de diferenças na região central do gene, de forma que essa similaridade pode indicar um possível risco zoonótico por APEC. Os grupos 1.A e 1.A.1 são compostos por 35 linhagens diferentes. Dessas, 14 são linhagens comensais de aves, 6 de *E. coli* humanas, 9 de diferentes serovars de *S. enterica* e apenas 3 de linhagens APEC (uma de onfalite, uma de síndrome da cabeça inchada e uma de septicemia). Todas as linhagens do grupo 1.A.1 apresentaram 90% de similaridade. Estes resultados indicam que o antígeno flagelar de linhagens comensais de *E. coli* aviárias possuem grande similaridade com o antígeno flagelar de *S. enterica*, o que pode indicar, novamente, uma origem genética similar desses dois grupos, o que está de acordo com dados da literatura que sugerem ancestralidade comum para o gene *fliC* de *E. coli* humana e *S. enterica*. Seguindo essa mesma linha de raciocínio, provavelmente ocorreram eventos genéticos que levaram à diferenciação de linhagens de APEC e *E. coli* humanas que foram agrupadas em 1.A.2. A proximidade entre estas linhagens suporta a condição de bactéria possivelmente zoonótica para APEC, hipótese reforçada pelo compartilhamento de traços patogênicos entre *E. coli* aviária e humana.