

Classificação de *Escherichia coli* Patogênica para as aves (APEC) em sete grupos filogenéticos e relação com a patogenicidade *in vivo*

MARINA PEREIRA CONDOTTA¹, CARLOS TADEU PIPPI SALLE²

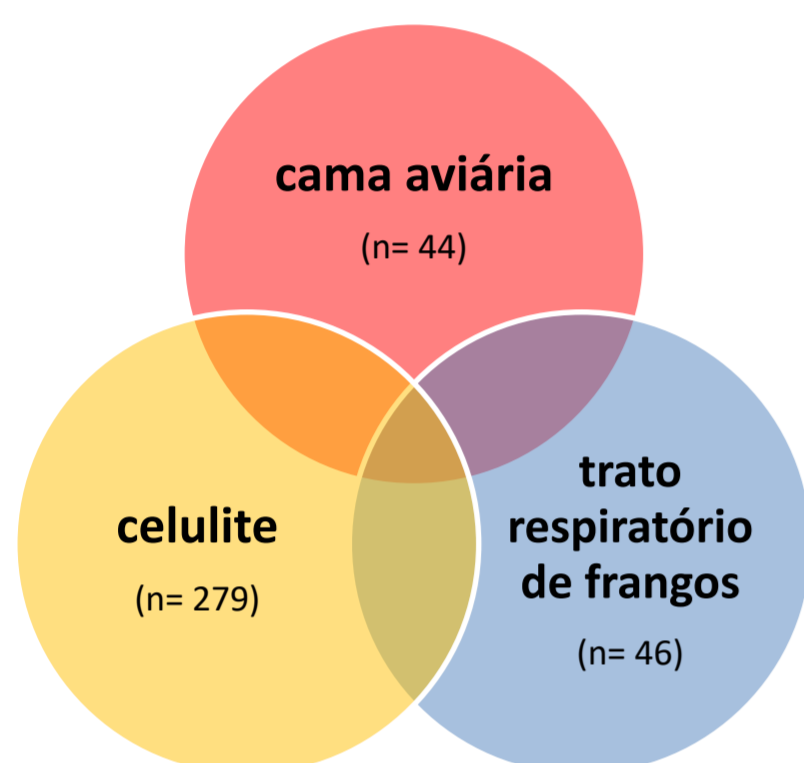
¹ Autor, Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
² Orientador, Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

INTRODUÇÃO

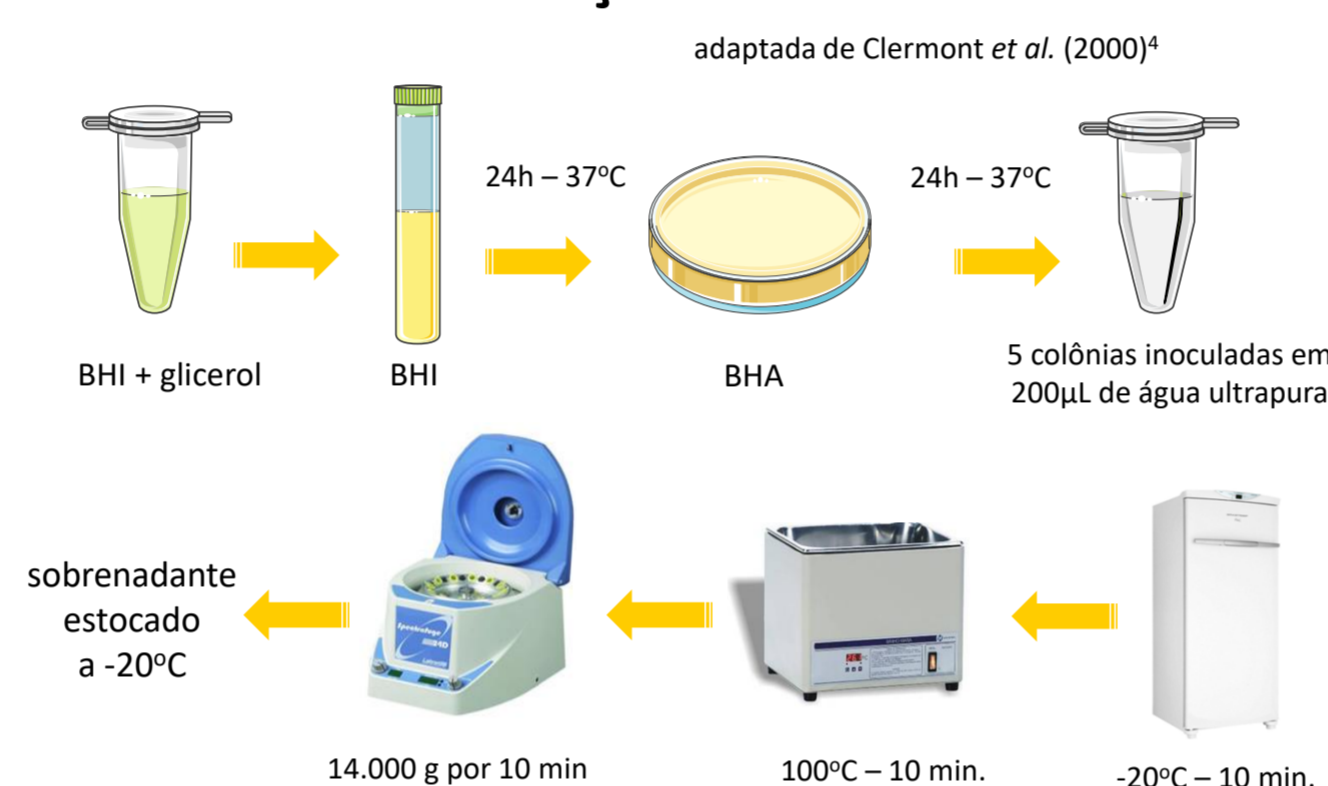
A patogenia das cepas extra intestinais de *Escherichia coli* não é totalmente compreendida, devido à heterogeneidade observada entre os isolados e a dificuldade em se distinguir cepas patogênicas e não patogênicas de *E. coli*¹. Por exemplo, genes de virulência de cepas originárias de animais ou seres humanos sintomáticos também são identificados em cepas comensais^{1,2}. Contudo, através da análise da estrutura genética, os isolados de *E. coli* podem ser classificados em grupos filogenéticos que mantêm uma relação com a origem de isolamento e a habilidade em causar doença³. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi classificar cepas de *Escherichia coli* patogênica para as aves (APEC) isoladas de lesões de celulite, do trato respiratório e da cama aviária em grupos filogenéticos e relacionar com a patogenicidade *in vivo*.

MATERIAIS E MÉTODOS

369 cepas APEC isoladas de:



Extração do DNA



Protocolo de multiplex-PCR

1) Primers e tamanho dos produtos de cada reação de multiplex-PCR

Reação	Genes	Sequência dos primers (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)
Quadruplex	chuA	F - ATGGTACGGACGAACCAAC R - TGCCGCCAGTACCAAGACA	288
	yjaA	F - CAAACGTGAAGTGCAGGAG R - AATGCGTCTCAACCTGTG	211
	TspE4C2	F - CACTATTGTAAGGTGATCC R - AGTTTATCGCTGCGGGTGGC	152
	arpA	F - AACGCTATTGCGCAGCTTGC R - TCTCCCATACCGTACGCTA	400
Grupo C	trpA	F - AGTTTATGCGCAGTGCAGG R - TCTGCGCGGTCAAGCC	219
	arpA	F - GATTTCATCTGTCAAATATGCC R - GAAAAGAAAAGAAATCCCAAGAG	301

Souza et al. (2016)⁵

Interpretação e classificação nos grupos filogenéticos

Genótipo quadruplex				Grupo filogenético	Confirmação
arpA	chuA	yjaA	TspE4C2		
+	-	-	-	A	***
+	-	-	+	B1	***
-	+	-	-	F	***
-	+	+	-	B2	***
-	+	+	+	B2	***
-	+	-	+	B2	***
+	-	+	-	A ou C	Reação PCR Grupo C
+	+	-	-	D ou E	Reação PCR Grupo C
+	+	-	+	D ou E	Reação PCR Grupo C

Adaptada de Clermont et al. (2013)⁴

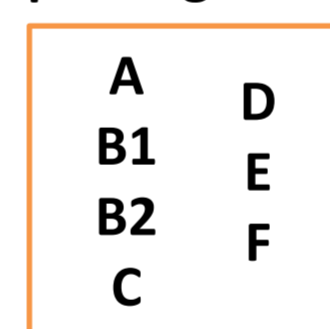
Associação dos grupos filogenéticos e do índice de patogenicidade *in vivo*

Inoculação experimental de cada amostra em 10 pintos SPF

$$IPI = (Tmx5) + P + Pe + Ph + A + C$$

IPI = índice de patogenicidade *in vivo* / Tm = Tempo de Morte / P = Pericardite / Pe = Peritonite
Ph = Perihepatite / A = Aerossaculite / C = Celulite

Grupo filogenético



versus

Agrupamento das cepas

Alta patogenicidade	IP entre 8 a 10
Média patogenicidade	IP entre 4 a 7
Baixa patogenicidade	IP entre 0 a 3

$$IP = \frac{\sum(IPI)}{N}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- O protocolo de multiplex-PCR foi capaz de classificar 100% das cepas APEC em um dos sete grupos filogenéticos propostos (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos sete grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D) observados nas 120 cepas de *Escherichia coli* APEC obtidos através da técnica de multiplex-PCR.

Patotipo	Grupo Filogenético	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
APEC	A	64	17,34
	B1	105	28,46
	B2	41	11,11
	C	24	6,5
	D	34	9,21
	E	45	12,2
	F	56	15,18

➡ A maioria das amostras foi classificada nos grupos B1 (28,46%) e A (17,34%), considerados apatogênicos e predominantes em aves⁶. A distribuição de isolados APEC nos grupos filogenéticos caracteriza-se pela variabilidade, sendo geralmente relacionada à origem dos isolados⁷.

➡ Comparando-se a distribuição dos grupos filogenéticos com o IP, constatou-se que as amostras pertencentes aos grupos B2 e E apresentaram IP significativamente maior em relação às amostras classificadas nos demais grupos.

➡ A pesquisa de 38 genes de virulência de *E. coli* foi proposta anteriormente para a predição da patogenicidade através do emprego de redes neurais artificiais⁸. Contudo, esta predição é mais laboriosa.

CONCLUSÃO

Os resultados no estudo ratificam o multiplex-PCR como uma alternativa para a classificação filogenética de *Escherichia coli* e para associação com a patogenicidade dos isolados de origem aviária.

REFERÊNCIAS:

¹KÖHLER, C.D., DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology*, v.301, n.8, p.642-647, 2011.
²DOBRINDT, U. (Patho-) Genomics of *Escherichia coli* - REVIEW; *International Journal of Medical Microbiology*, v.295, n.6-7, 5 p.357-371, 2005
³CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.10, p.4555-4558, 2000.
⁴CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, v.5, n.1, p. 58-65, 2013.

⁵SOUZA G.F. et al. Classification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* by a Novel Pathogenicity Index Based on an Animal Model. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.44: n.1347, p.1-8, 2016.

⁶EWERS C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*, v.297, n.3, p.163-176, 2007.

⁷RODRIGUEZ-SIEK K.E. et al. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, v.151, n.6, p.2097-2110, 2005.

⁸TEJKOWSKI T.M. 2013. Perfil da patogenicidade de *Escherichia coli* patogênica para as aves (APEC) através da utilização de Redes Neurais Artificiais (RNAs). 64f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.