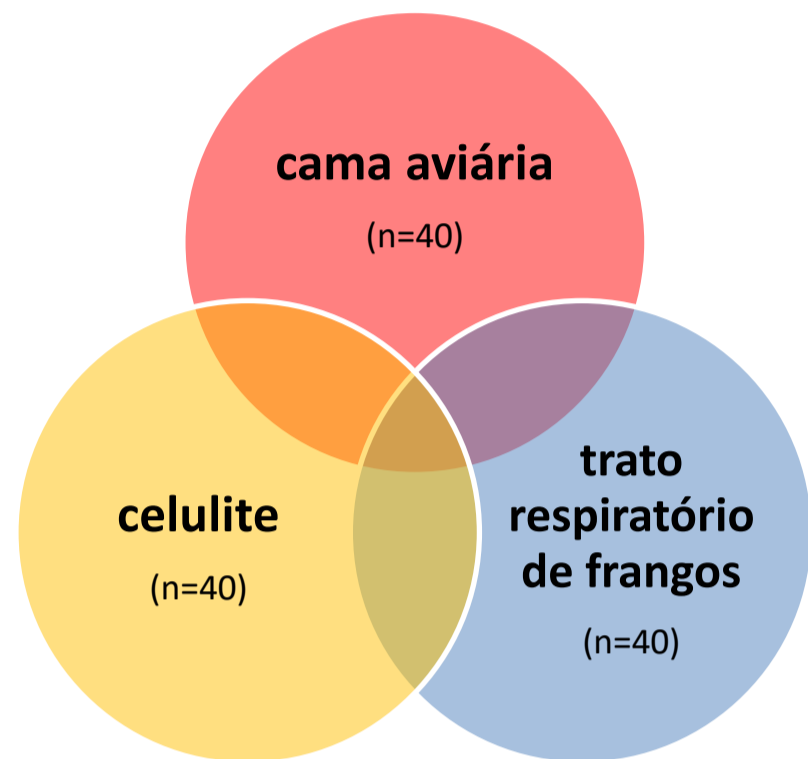


INTRODUÇÃO

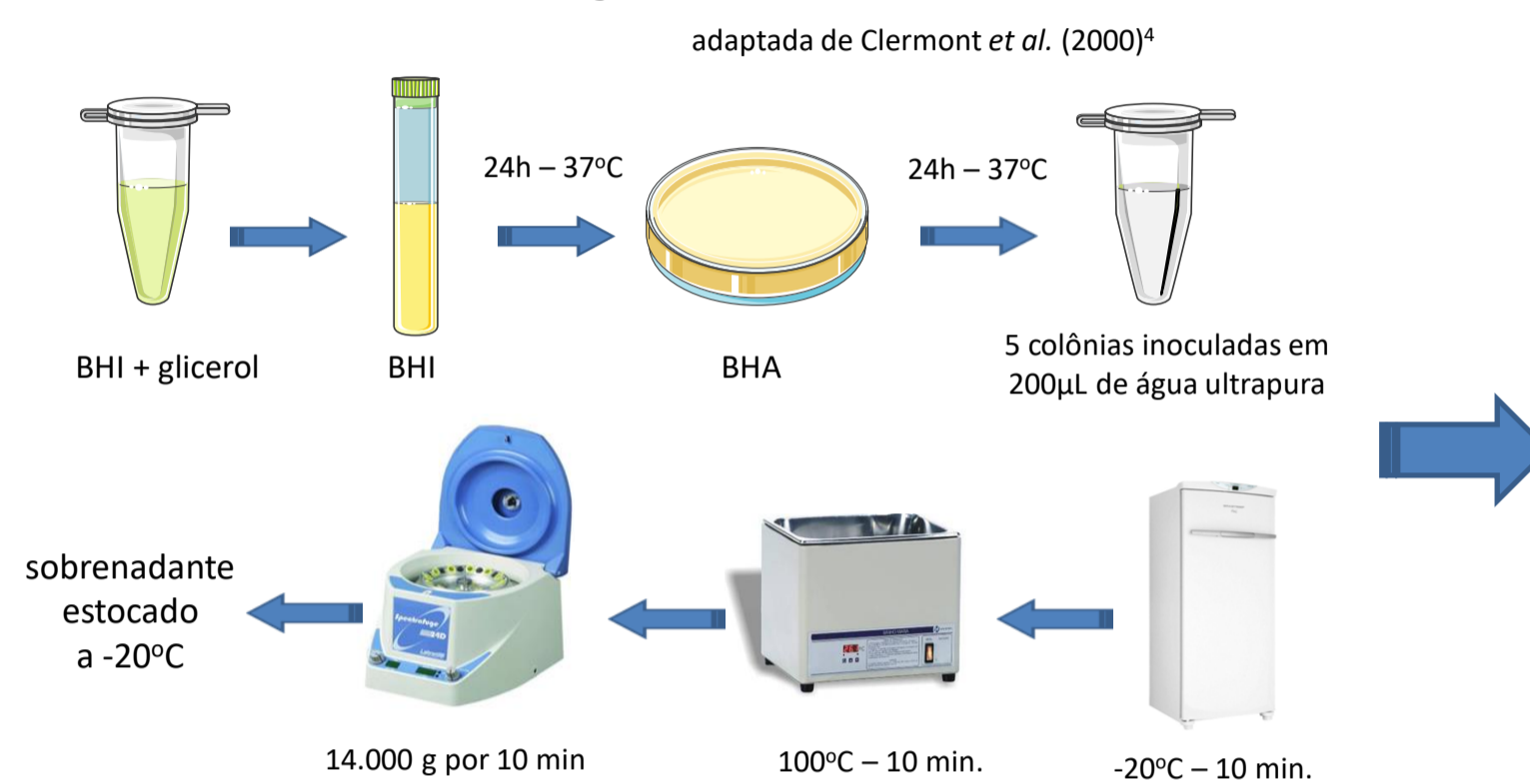
Escherichia coli é uma bactéria Gram negativa presente no trato digestivo de humanos e de animais¹. As cepas de origem aviária (APEC - *Avian Pathogenic Escherichia coli*) são responsáveis por grandes perdas econômicas e estão envolvidas tanto em casos clínicos nas granjas, geralmente associadas a outros microrganismos, quanto no aumento de condenações de carcaças ao abate^{1,2}. O controle da colibacilose aviária é complexo, pois envolve a diferenciação entre as cepas que comumente habitam o trato gastrointestinal das aves daquelas consideradas patogênicas^{2,3}. Assim, o objetivo deste estudo foi a classificação de *E. coli* isoladas de aves (APEC) em grupos filogenéticos e a avaliação da relação destes grupos com a patogenicidade das cepas.

MATERIAIS E MÉTODOS

120 cepas APEC isoladas de:



Extração do DNA



Protocolo de multiplex-PCR

1) Primers:

Genes	Sequência dos primers (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)
chuA	F - GACGAACCAACGGTCAGGAT R - TGCCGCCAGTACCAAGACA	279
YjaA	F - TGAAGTGTGACGAGACGCTG R - ATGGAGAATGGTCTCTCAA	211
TspE4C2	F - GAGTAATGTCGGGGCATTCA R - CGGCCAACAAAGTATTACG	152

2) Composição do mix:

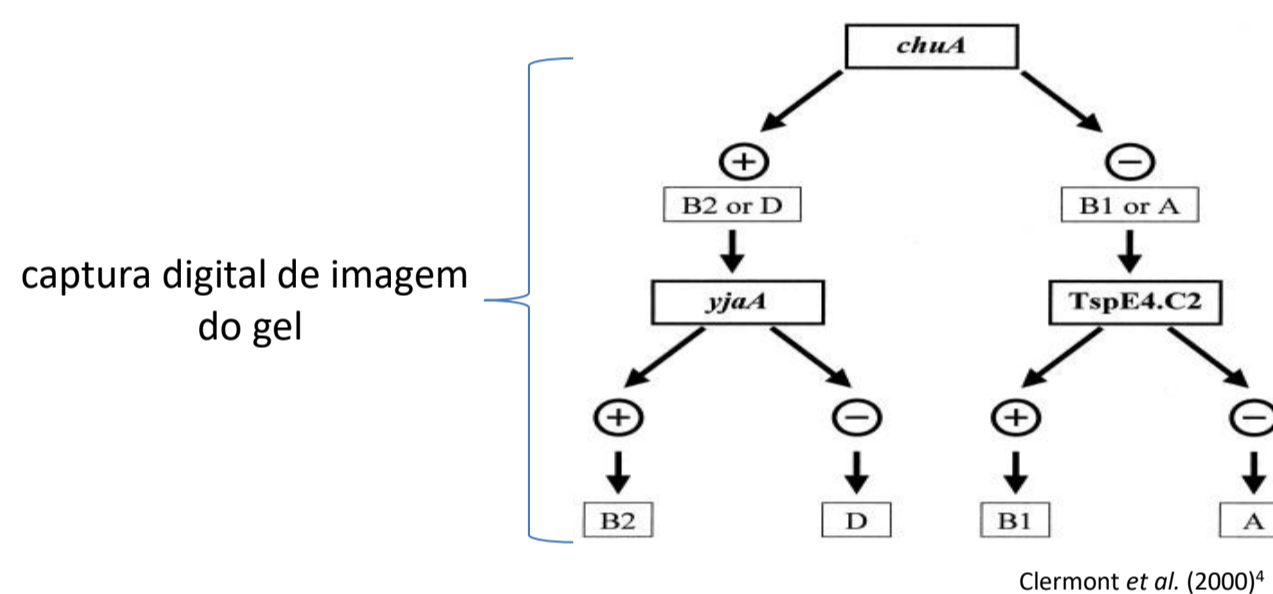
2,5 µL de solução Tampão 10x (Invitrogen), 2 µL de dNTP 2mM (Invitrogen), 2 µL de cada primer 20 pmol (Invitrogen), 1,5 U de *GoTaq*™ Hot Start Polymerase (Invitrogen), 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 5 µL de DNA.

3) Condições do termociclador:

✓ 94°C por 5 min
 ✓ 94°C por 30 seg
 ✓ 55°C por 30 seg
 ✓ 72°C por 30 seg
 ✓ 72°C por 7 min
 30 ciclos

Interpretação e classificação nos grupos filogenéticos

Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. / captura digital de imagem do gel



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

Souza *et al.* (2016)⁵

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

A
 B1
 B2
 D
 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 quatro grupos filogenéticos propostos (Tabela 1).

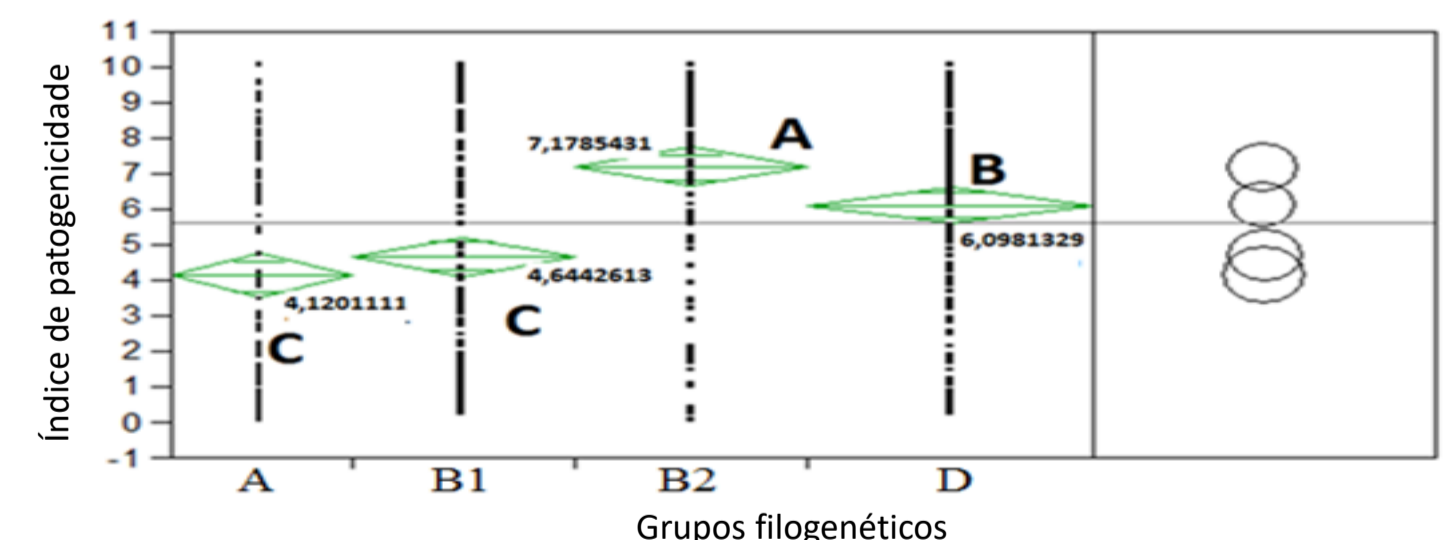
Tabela 1 - Distribuição dos quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) observados nas 120 cepas de *Escherichia coli* APEC obtidos através da técnica de multiplex-PCR.

Patotipo	Grupo Filogenético	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
APEC	A	24	19,6
	B1	29	24,1
	B2	30	25,2
	D	37	31,1

A distribuição das cepas do patotipo APEC não ocorreu de maneira similar a de outros trabalhos, os quais geralmente descrevem a predominância do grupo A^{6,7}. A distribuição de isolados APEC nos grupos filogenéticos caracteriza-se pela variabilidade, sendo geralmente relacionada à origem dos isolados⁴.

O IP médio das cepas do grupo B2 foi significativamente superior ao do grupo D. Contudo, o IP médio destes dois grupos foi significativamente maior ao dos grupos A e B1, considerados apatogênicos para as aves.

Gráfico 1 - Associação dos quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) com a média dos índices de patogenicidade (IP) para as 120 cepas de *Escherichia coli* APEC.



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 laboriosa, pois consiste na realização de seis diferentes protocolos de multiplex-PCR. Por outro lado, a classificação de *E. coli* em grupos filogenéticos através do protocolo selecionado no atual estudo envolve uma única reação.

CONCLUSÃO

A distribuição das cepas APEC em grupos filogenéticos apresentou associação com o IP, assim a classificação através do multiplex-PCR torna-se uma importante ferramenta para a monitoria da patogenicidade dos isolados de *E. coli* na cadeia avícola.

REFERÊNCIAS:

- BARNES H.J., NOLAN L.K. & VAILLANCOURT J.P. 2008. Colibacilosis In: Saf Y.M. (Ed). Diseases of Poultry. 12.ed. Ames: Iowa State Press, pp.691-732. AGARWAL, R.K. *et al.* Optimization of microtiter plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. *International Food Research Journal*, v.18, p. 1493-1498, 2011.
- NAKAZATO G. *et al.* Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Review. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.7, p.479-486, 2009.
- TOUZAIN F. *et al.* Small variable segments constitute a major type of diversity of bacterial genomes at the species level. *Genome Biology*, v.11, n.4, R45, 2010.
- CLERMONT, 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.
- SOUZA 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.
- EWERS 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.
- RODRIGUEZ-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.
- TEJKOWSKI 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.