

Classificação de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) em grupos filogenéticos e associação com a patogenicidade *in vivo*

Classification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) and Human Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in Phylogenetic Groups and Association with Pathogenicity *In Vivo*

Silvio Luís da Silveira Rocha, Thales Quedi Furian, Karen Apellanis Borges, Daniela Tonini da Rocha, Hamilton Luiz de Souza Moraes, Carlos Tadeu Pippi Salle & Vladimir Pinheiro do Nascimento

ABSTRACT

Background: Avian pathogenic *E. coli* (APEC) and uropathogenic *E. coli* (UPEC) are responsible, respectively, for avian colibacillosis and for 80% of urinary tract infections in humans. *E. coli* control is difficult due to the absence of a reliable method to differentiate pathogenic and commensal strains. Genetic similarity between APEC and UPEC suggests a common ancestral origin and the capability of potentially pathogenic strains to affect human health. The classification in phylogenetic groups facilitates the identification of pathogenic strains. The objective of this work was to classify APEC and UPEC *E. coli* strains into phylogenetic groups and to associate it with *in vivo* pathogenicity.

Materials, Methods & Results: 460 APEC and 450 UPEC strains, stored in BHI with glycerol at -80°C, were selected. APEC strains were isolated from cellulitis, respiratory tract and poultry litter of broiler flocks from Southern Brazil. The UPEC strains from urinary tract infection were provided by a hospital in Porto Alegre. After DNA extraction, APEC and UPEC strains were classified into four phylogenetic groups (A, B1, B2 and D) by a multiplex-PCR protocol for the detection of the *chuA* and *yjaA* genes and the TspE4.C2 DNA fragment. Phylogenetic groups were associated with pathogenicity indexes (PI), presented on a scale of 0 to 10, which were previously obtained through the inoculation of APEC strains in one-day-old chicks. Phylogenetic groups were also associated with the presence of 38 virulence-associated genes. The multiplex-PCR protocol was able to differentiate 100% of the APEC and UPEC strains in the four phylogenetic groups. The majority of APEC strains were classified into phylogenetic groups D (31.1%) and B2 (24.1%). On the other hand, the majority of UPEC strains were classified into B2 (53.6%). Among APEC strains, five genes (*crl*, *mat*, *ompA*, *fimC* and *fimH*) were detected in more than 80% of strains in all groups. Some genes showed a significant association with specific phylogenetic groups. Gene *ireA* was exclusively to group D, *kpsMT II* and *cvaC* to B2 and *sat* was exclusively to B1. Four genes (*ireA*, *sfa/focCD*, *ibeA*, *tsh*) were detected in more than 70% of UPEC strains in all phylogenetic groups. Gene *iroN1* showed a significant association exclusively to group A, and *iucD*, *papC* and *irp2* to B1 group. APEC isolated from poultry litter presented significantly lower PIs than those isolated from cellulitis and from birds with respiratory signs. The average PI from B2 group was significantly higher than that of D group. In addition, the PIs of the two groups were significantly higher than those of A and B1.

Discussion: The high frequency of UPEC classified as B2 is in agreement with the literature. More virulent strains are usually classified into B2 group and some of them may be classified into D group. On the other hand, the distribution of APEC isolates in phylogenetic groups is characterized by variability and it is usually related to the origin of the isolates, as observed in the study. Since *E. coli* strains isolated from human and poultry face similar challenges in infection establishment of extraintestinal sites, they may share some virulence genes. In this study, most of the 38 genes presented a high frequency in both APEC and UPEC strains. As the distribution of APEC strains in phylogenetic groups showed a significant association with pathogenicity, multiplex-PCR becomes an important tool for screening the pathogenicity of strains isolated from the poultry production chain.

Keywords: molecular characterization, colibacillosis, urinary tract, pathogenicity index.

INTRODUÇÃO

Aproximadamente 10% das cepas de *Escherichia coli* são consideradas patogênicas, podendo causar infecções intestinais e extraintestinais (ExPEC) [9]. Entre os isolados ExPEC, destacam-se os patotipos de *E. coli* patogênica aviária (APEC), causador da colibacilose, uma das principais causas de mortalidade dos lotes aviários, e de *E. coli* uropatogênica (UPEC), responsável por 80% das infecções do trato urinário em seres humanos [1,8,11,14].

Como a bactéria está distribuída no ambiente, o controle da colibacilose é difícil e depende de um método confiável que diferencie cepas patogênicas daquelas que habitam o trato gastrointestinal. A diminuição da resistência do hospedeiro devido à imunodepressão resulta em infecções que não são restritas a um único patotipo [3]. Assim, devido às variações ambientais e intrínsecas das cepas quanto à capacidade de causar lesões nos hospedeiros, experimentos *in vivo* para avaliar a patogenicidade da bactéria em aves tem sido desenvolvidos [15,17,20].

A similaridade genética entre APEC e UPEC sugere uma origem ancestral comum e uma capacidade de cepas potencialmente patogênicas em comprometer a saúde humana [4]. Se estes patotipos são semelhantes geneticamente, o potencial reservatório de genes de virulência de cepas APEC para isolados ExPEC humanos deve ser considerado [5,7]. Da mesma forma, a classificação molecular de *E. coli* em quatro grupos filogenéticos proposta anteriormente [2] auxilia na identificação de cepas patogênicas ou comensais [19].

O objetivo deste estudo foi realizar a classificação de cepas de *E. coli* APEC e UPEC em grupos filogenéticos e associação com a patogenicidade *in vivo*, genes de virulência e origem dos isolados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas de Escherichia coli

Para este estudo, 460 cepas APEC e 450 cepas UPEC estocadas a -80°C em caldo infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion Broth - BHI)¹ com glicerol² na proporção de 4:1, foram selecionadas. As cepas APEC foram isoladas entre 2002 e 2008 a partir de lesões de celulite, de quadros respiratórios e de cama aviária de aves de lotes de frangos de corte de 60 propriedades integradas a três empresas avícolas da

Região Sul do Brasil. As cepas UPEC foram cedidas por um hospital de Porto Alegre e foram isoladas de pacientes que apresentavam infecção urinária no ano de 2012.

Reativação das cepas

A reativação e os testes preliminares de confirmação pureza das cepas foram realizados de acordo com Lee & Nolan [10]. As cepas foram reativadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 h. Após este período, foi realizada a semeadura por esgotamento em ágar EMB (Eosin Methylene Blue - EMB)¹ e o material foi incubado a 37°C por 24 h. As colônias presentes no ágar EMB que apresentavam coloração verde metálica foram avaliadas de acordo com a sua morfologia e foram selecionadas para a realização dos testes de catalase e de oxidase, para a coloração pelo método de Gram [14] e para a realização de testes bioquímicos complementares [10].

Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada através do método por calor, adaptada a partir da técnica descrita anteriormente [2]. O material foi armazenado a -20°C até o momento da análise por PCR.

Classificação das cepas em grupos filogenéticos através de multiplex-PCR

As cepas APEC e UPEC foram classificadas em quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D) através do esquema de discriminação desenvolvido por Clermont *et al.* [2], o qual é baseado na detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2 através de multiplex-PCR. Pertencem ao grupo A os isolados *chuA* (-), *yjaA* (+/-) e TSPE4.C2 (-). Os isolados *chuA* (-), *yjaA* (+/-) e TSPE4.C2 (+) pertencem ao grupo B1, e os isolados *chuA* (+), *yjaA* (+) e TSPE4.C2 (+/-) são classificados no grupo B2. Os isolados *chuA* (+), *yjaA* (-) e TSPE4.C2 (+/-) pertencem ao grupo D. O mix da reação foi composto por 2,5 µL de solução Tampão 10x (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl [pH 8,3]³), 2 µL de trifosfatos desoxinucleosídeos (2 mM)³, 2 µL de cada primer ou oligonucleotídeo (20 pmol) 3, 1,5 U de GoTaq Hot Start Polymerase³, 1,5 mM de MgCl₂³, 5 µL de DNA e água ultrapura para completar um volume final de 25 µL. A sequência dos primers selecionados³ e o tamanho esperado dos amplicons estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos primers e tamanho dos fragmentos de amplificação dos genes pesquisados para determinação dos grupos filogenéticos.

Gene	Sequência dos primers (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência dos primers
<i>chuA</i>	F - GACGAACCAACGGTCAGGAT R – TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	[2]
<i>yjaA</i>	F - TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG R – ATGGAGAATGCGTTCTCAA	211	[2]
TspE4C2	F - GAGTAATGTCGGGGCATTCA R – CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	[2]

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Thermal Cycler 2720⁴, sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, de anelamento a 55°C por 30 s e de extensão a 72°C por 30 s; além da extensão final a 72°C por 7 min. A eletroforese dos produtos amplificados foi desenvolvida em gel de agarose³ a 1,5% corado com brometo de etídeo⁵. As imagens foram capturadas digitalmente por um sistema de captação AlphaDigDoc Pro⁶ e foram posteriormente interpretadas.

Associação dos grupos filogenéticos com os índices de patogenicidade

O grupo filogenético de cada cepa APEC foi associado aos índices de patogenicidade *in vivo* obtidos através da inoculação experimental de pintos comerciais com 01 dia de idade [20]. Neste trabalho prévio, 0,1 mL de um inóculo bacteriano contendo 10⁸ UFC/mL foi inoculado através da via intraperitoneal. As aves foram avaliadas quanto à presença ou ausência de cinco lesões macroscópicas e quanto ao tempo de morte por um período de 07 dias. Desta forma, as cepas foram classificadas em índices de patogenicidade (IP) em uma escala de 0 a 10 [20].

Associação dos grupos filogenéticos com a pesquisa de genes de virulência

A classificação das cepas dos patotipos APEC e UPEC em grupos filogenéticos foi associada com a presença de 38 genes associados à virulência da bactéria. Entre estes, genes responsáveis pela capacidade de adesão (*afa/draB*, *crl*, *fimC*, *fimH*, *hra*, *iha*, *papC*, *papG*, *sfa/focC*, *tsh*, *mat* e *felA*), invasão (*gimB*, *ibeA*, *tia* e *cvaC*), aquisição de ferro (*chuA*, *fyuA*, *ireA*, *ironA*, *irp2*, *iucD*, *sitD/chr*, *sitDep* e *iutA*), resistência sérica (*cvi/cva*, *iss*, *neuC*, *kpsMT II*, *ompA* e *traT*), toxinas (*astA*, *cnfI/2*,

sat, *vat* e *hlyA*), transporte sérico (*pic*) e genes de ilhas de patogenicidade (*malX*). A pesquisa destes genes foi previamente realizada através do emprego de protocolos de multiplex-PCR desenvolvidos anteriormente [21].

Análises estatísticas

A análise de estatística descritiva foi empregada para a determinação da frequência absoluta e relativa das cepas em cada um dos grupos filogenéticos. Os testes não paramétricos do Qui-quadrado (χ^2) e o Teste Exato de Fisher foram utilizados para determinar se existe associação dos grupos filogenéticos e da presença individual dos 38 genes de virulência selecionados. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação das médias dos índices de patogenicidade das cepas APEC e UPEC conforme o grupo filogenético. O programa PASW foi utilizado para as análises estatísticas, adotando-se como referencial o nível de significância de 5% e o nível de confiança de 95%.

RESULTADOS

O protocolo de multiplex-PCR adaptado foi capaz de diferenciar 100% das cepas de *E. coli* APEC e UPEC nos quatro grupos filogenéticos propostos. As frequências relativa e absoluta dos grupos filogenéticos observados estão descritos na Tabela 2. Quanto à distribuição das cepas APEC, 31,1% (90/460) foram classificadas no grupo D, 25,2% (111/460) no grupo B2, 24,1% no grupo B1 (116/460) e 19,6% (143/460) no grupo A. Em relação ao patotipo UPEC, a frequência relativa foi de 53,6% no grupo B2 (241/450), 25,3% (114/450) no grupo D, 15,1% (68/450) no grupo A e apenas 6,0% (27/450) no grupo B1.

Na Tabela 3 estão descritas as frequências relativas dos genes de virulência pesquisados para cada grupo filogenético das cepas APEC e UPEC.

Tabela 2. Distribuição dos quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) observados nas 460 cepas de *Escherichia coli* APEC e 450 cepas de *Escherichia coli* UPEC obtidos através da técnica de multiplex-PCR.

Patotipo	Grupo Filogenético	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
APEC	A	90	19,6
	B1	111	24,1
	B2	116	25,2
	D	143	31,1
UPEC	A	68	15,1
	B1	27	6,0
	B2	241	53,6
	D	114	25,3

Tabela 3. Frequência relativa (%) dos 38 genes de virulência pesquisados para cada grupo filogenético (A, B1, B2 e D) entre as 460 cepas de *Escherichia coli* APEC e 450 cepas de *Escherichia coli* UPEC.

Gene	APEC				UPEC			
	A	B1	B2	D	A	B1	B2	D
<i>crl</i>	98,9	96,4	94,8	93,0	95,6	96,3	90,9	96,5
<i>papG</i>	8,9	7,2	16,4	13,3	69,1	70,4	68,5	86,0
<i>fimH</i>	93,3	86,5	94,8	95,8	25,0	14,8	41,1	20,2
<i>mat</i>	90,0	84,7	83,6	85,3	82,4	92,6	88,4	92,1
<i>sfa/focCD</i>	0,0	0,9	4,3	1,4	2,9	3,7	31,5	10,5
<i>afa/drab</i>	10,0	7,2	5,2	5,6	23,5	25,9	20,7	16,7
<i>iha</i>	11,1	4,5	9,5	12,6	11,8	18,5	31,5	32,5
<i>hlyA</i>	30,0	30,6	49,1	42,0	52,9	37,0	64,3	44,7
<i>fimC</i>	97,8	93,7	98,3	96,5	88,2	85,2	78,0	75,4
<i>papC</i>	27,8	23,4	25,0	30,1	50,0	37,0	67,2	66,7
<i>tsh</i>	35,6	22,5	58,6	51,7	11,8	3,7	18,3	7,9
<i>felA</i>	0,0	7,2	5,2	7,0	19,1	22,2	22,4	18,4
<i>cnfI/2</i>	1,1	0,9	6,9	2,1	35,3	33,3	69,7	56,1
<i>hlyA</i>	10,0	3,6	3,4	7,0	25,0	7,4	53,1	15,8
<i>sat</i>	35,6	43,2	13,8	21,7	67,6	63,0	52,3	57,9
<i>vat</i>	13,3	6,3	34,5	30,8	36,8	25,9	59,3	28,1
<i>EAST1</i>	48,9	43,2	42,2	48,3	30,9	7,4	15,4	11,4
<i>ireA</i>	38,9	26,1	58,6	74,8	5,9	11,1	19,9	13,2
<i>fyuA</i>	24,4	10,8	58,6	40,6	42,6	29,6	79,3	57,9
<i>sitD.ep</i>	64,4	55,9	73,3	72,7	32,4	25,9	13,3	20,2
<i>iroN1</i>	64,4	64,9	77,6	71,3	29,4	29,6	44,8	19,3
<i>sitD</i>	30,0	29,7	42,2	18,9	39,7	40,7	74,3	46,5
<i>chuA</i>	1,1	0,0	101,7	98,6	25,0	29,6	83,4	85,1
<i>iucD</i>	61,1	54,1	83,6	86,0	50,0	25,9	56,0	66,7
<i>irp2</i>	28,9	21,6	69,0	60,8	54,4	37,0	72,2	61,4
<i>iutA</i>	55,6	50,5	76,7	82,5	89,7	85,2	94,2	96,5
<i>neuC</i>	33,3	11,7	38,8	14,0	44,1	44,4	29,0	31,6
<i>traT</i>	88,9	82,9	93,1	91,6	63,2	74,1	58,9	62,3
<i>kpsMTII</i>	58,9	58,6	75,9	64,3	63,2	77,8	88,0	88,6
<i>ompA</i>	101,1	92,8	95,7	94,4	95,6	92,6	87,6	92,1
<i>cvi/cva</i>	48,9	55,0	61,2	45,5	54,4	37,0	50,6	52,6
<i>iss</i>	64,4	71,2	79,3	74,8	42,6	44,4	42,3	35,1
<i>cvaC</i>	46,7	36,9	74,1	44,8	22,1	14,8	33,2	27,2
<i>ibeA</i>	18,9	19,8	46,6	23,8	2,9	7,4	22,4	12,3
<i>gimB</i>	14,4	14,4	24,1	10,5	16,2	7,4	15,8	13,2
<i>tia</i>	32,2	14,4	25,9	25,9	50,0	48,1	53,9	39,5
<i>malX</i>	23,3	16,2	34,5	11,9	42,6	55,6	81,7	49,1
<i>pic</i>	7,8	6,3	18,1	32,2	14,7	22,2	29,5	28,9

Em relação à associação estatística entre a presença de um determinado gene de virulência e os grupos filogenéticos no patotipo APEC, dez genes (*cnf1/2*, *hlyA*, *EAST1*, *tia*, *sfa/focCD*, *afa/drab*, *ihA*, *felA*, *papG*, *traT*) não apresentam associação com nenhum dos grupos, e cinco deles (*crl*, *mat*, *ompA*, *fimC* e *fimH*) apresentaram uma frequência superior a 80% em todos os grupos. Os genes *ireA*, *sitD ep*, *iroN1*, *chuA*, *iucD*, *iutA* e *iss* apresentaram associação com o grupo filogenético D, sendo *ireA* exclusivamente com este grupo. Os genes *sitD ep*, *iroN1*, *chuA*, *iucD*, *iutA*, *kpsMT II*, *iss* e *cvaC* demonstraram associação com o grupo B2, sendo *kpsMT II* e *cvaC* exclusivamente com este grupo. Apenas os genes *iss* e *sat* apresentaram associação com o grupo B1, sendo *sat* exclusivamente com este grupo.

Em relação à associação estatística entre a presença de determinado gene de virulência e os grupos filogenéticos no patotipo UPEC, 15 genes (*crl*, *sat*, *mat*, *afa/drab*, *neuC*, *fimC*, *piC*, *ompA*, *gimB*, *traT*, *cvi/cva*, *iss*, *felA*, *iutA* e *cvaC*) não apresentam associação com nenhum dos grupos, e quatro deles (*ireA*, *sfa/focCD*, *ibeA* e *tsh*) apresentaram frequência superior a 70% em todos os grupos. Os genes *fyuA*, *iroN1* e *chuA*, *ihA*, *papG*, *fimH*, *cnf 1/2* e *hlyA* estão associados com o grupo A, sendo *iroN1* associado exclusivamente com este grupo. Os genes *fyuA*, *chuA*, *iucD*, *irp2*, *cnf 1/2*, *hlyA*, *vat*, *EAST1*, *adesina ihA*, *papG*, *papC* e

fimH estão relacionados com o grupo B1, sendo os genes *iucD*, *papC* e *irp2* associados exclusivamente com este grupo. *sitD ep* e *EAST1* estão associados com o grupo B2, e *hlyA*, *sitD ep*, *vat*, *EAST1* e *fimH* com o grupo A.

No Gráfico 1 estão descritas as associações entre o IP em base log e a origem de isolamento das cepas APEC. Observou-se diferença significativa entre os IPs conforme a fonte de isolamento. As cepas isoladas de cama aviária apresentaram índices de patogenicidade significativamente menores ($P < 0,05$) do que aquelas isoladas de lesão de celulite e do trato respiratório.

No Gráfico 2 estão demonstradas a associação estatística dos grupos filogenéticos com a média do IP das 460 cepas de *E. coli* APEC que foram classificadas nos quatro grupos.

Os resultados demonstram diferença significativa ($P < 0,05$) entre os IPs médios obtidos *in vivo* conforme a classificação em grupos filogenéticos. As cepas do grupo B2 apresentaram um índice de patogenicidade médio de 7,18, seguido pelo grupo D com a média de 6,10 e das cepas dos grupos A e B1, considerados comensais, com médias do IP de 4,12 e 4,64, respectivamente. A média do IP das cepas do grupo B2 foi significativamente maior ($P < 0,05$) em relação à média do grupo D. Além disto, os IPs destes dois grupos foram significativamente superiores aos índices das cepas dos grupos A e B1.

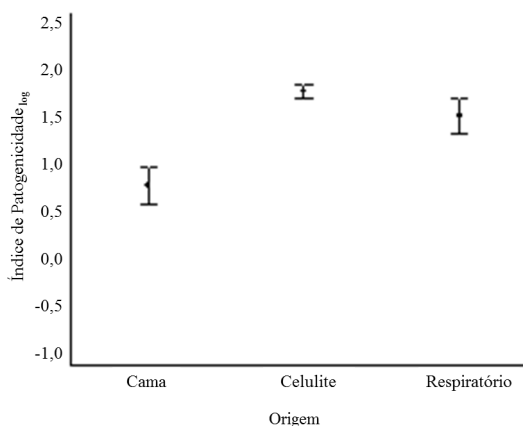


Figura 1. Associação do índice de patogenicidade (IP) com a origem de isolamento das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

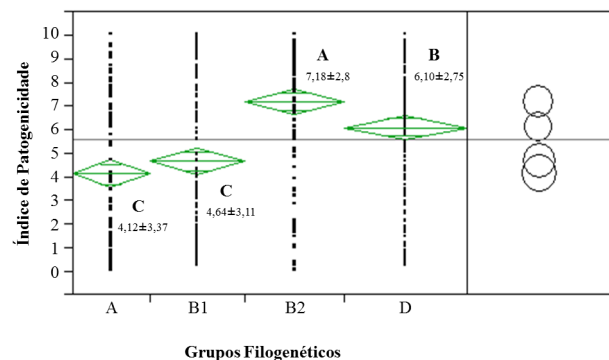


Figura 2. Associação dos quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) observados com a média dos índices de patogenicidade (IP) para as 460 cepas de *Escherichia coli* APEC. Letras diferentes representam diferença significativa ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

O protocolo de multiplex-PCR para a classificação filogenética de *E. coli* permitiu a diferenciação das cepas selecionadas. Destaca-se que Clermont *et al.* [2] compararam os resultados obtidos através do multiplex-PCR com as classificações atribuídas através do método de MLST (*Multi Locus Sequence Typing*), selecionando-se cepas de uma coleção de referência (ECOR) recuperadas a partir de diferentes hospedeiros e habitats.

A classificação majoritária de cepas UPEC no grupo B2 observado neste estudo é ratificada em diferentes pesquisas citadas na literatura [7,22]. Rodrigues-Siek *et al.* [18] classificaram 65% dos isolados UPEC provenientes de pacientes internados na UTI (Unidade de Terapia Intensiva) no mesmo grupo. Cepas virulentas geralmente classificam-se no grupo B2, apesar de alguns exemplares poderem ser classificados no grupo D [2,6,19]. É importante salientar que a maior frequência de cepas no grupo B2 no estudo era esperada, uma vez que as mesmas foram isoladas de pacientes que procuraram o hospital devido à suspeita de infecção urinária.

A fronteira entre o comensalismo e a virulência resulta de um complexo equilíbrio entre o *status* imune do hospedeiro e a presença ou expressão de fatores de virulência nas bactérias [16]. A condição imunológica do hospedeiro, além da condição sanitária, também se refere a fatores associados. Entre as cepas UPEC, houve uma maior frequência de isolados de pacientes do sexo feminino (80,6%). Os fatores de risco do hospedeiro que propiciam o estabelecimento de cistites, como a gravidez e a diabetes, estão associados à maior patogenicidade da bactéria [6]. Contudo, as cepas foram classificadas no grupo filogenético B2 (53,2%), independentemente do gênero do paciente. Isto é, não houve associação significativa ($P > 0,05$) entre o sexo e a classificação dos isolados nos quatro grupos filogenéticos.

Por outro lado, a distribuição das cepas do patotipo APEC não ocorreu de maneira similar ao de outros trabalhos, os quais geralmente descrevem a predominância do grupo A [7,18,22]. A distribuição de isolados do patotipo APEC nos grupos filogenéticos caracteriza-se pela variabilidade, sendo geralmente relacionada à origem dos isolados [2]. Esta situação foi observada neste estudo, considerando-se os grupos filogenéticos das cepas e a sua relação com a origem - cama, celulite, lesão respiratória - e a patogenicidade dos isolados.

Uma vez que as estirpes de *E. coli* isoladas de humanos e de aves enfrentam desafios semelhantes ao estabelecer a infecção em locais extra-intestinais, estas podem compartilhar genes de virulência e a capacidade de causar doença [9,12]. No atual estudo, a maioria dos 38 genes de virulência pesquisados apresentou uma alta frequência entre os patotipos APEC e UPEC. Embora pesquisas anteriores também tenham comparado os genes de virulência entre cepas UPEC e APEC, não existem estudos que analisem a expressão dos genes de virulência específicos entre estes patotipos em um mesmo modelo de desafio *in vivo* [22]. Assim, esta consiste em uma importante etapa futura a ser realizada.

Os resultados demonstram que a classificação de *E. coli* em grupos filogenéticos a partir de um protocolo de multiplex-PCR permite inferir a patogenicidade da bactéria. Anteriormente, a pesquisa de 38 genes de virulência de *E. coli* foi proposta como variável para a predição da patogenicidade da mesma bactéria através do emprego de redes neurais artificiais [21]. Contudo, esta etapa fundamental, que consiste na elaboração de reações de multiplex-PCR, é laboriosa, pois envolve a realização de seis diferentes protocolos, a interpretação a partir da visualização de diversas bandas de DNA em gel, além do longo período necessário para obtenção dos resultados.

Por outro lado, a classificação de *E. coli* em grupos filogenéticos através do protocolo selecionado no atual estudo envolve uma única reação. Como a distribuição das cepas APEC nos grupos filogenéticos apresentou associação significativa com a patogenicidade, o multiplex-PCR torna-se uma importante ferramenta disponível para o *screening* da patogenicidade das cepas isoladas na cadeia avícola.

CONCLUSÕES

O protocolo de multiplex-PCR adaptado foi capaz de diferenciar 100% das cepas APEC e UPEC nos grupos filogenéticos propostos, demonstrando ser uma importante ferramenta para o acompanhamento da flutuação da patogenicidade das cepas de *E. coli*. Os grupos D e B2 foram predominantes entre as cepas APEC, enquanto o grupo B2 foi majoritário entre cepas UPEC. Observou-se associação dos grupos com a origem de isolamento e com a patogenicidade das cepas, assim como com os índices de patogenicidade das cepas dos grupos B2 e D apresentaram índices superiores aos observados pelas cepas dos grupos A e B1.

MANUFACTURERS

¹Oxoid Microbiology Products/ Thermo Scientific. Cambridge, U.K.

²Dinâmica Química Contemporânea. São Paulo, SP, Brazil.

³Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific. Carlsbad, CA, USA.

⁴Life Technologies. Singapore, Singapore.

⁵Ludwig Biotecnologia. Porto Alegre, RS, Brazil.

⁶AlphaInnotech®. San Leandro, CA, USA

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest and are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Barnes H.J., Nolan L.K. & Vaillancourt J.P. 2008. Colibacillosis In: Saf Y.M. (Ed). *Diseases of Poultry*. 12th edn. Ames: Iowa State Press, pp.691-732.
- 2 Clermont O., Bonacorsi S. & Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(10): 4555-4558.
- 3 Collingwood C., Kemmett K., Willians N. & Wigley P. 2014. Is the concept of avian pathogenic *Escherichia coli* as a single pathotype fundamentally flawed? *Frontiers in Veterinary Science*. 1: 1-4.
- 4 Croxen M.A. & Finlay B.B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 8(1): 26-38.
- 5 Dobrindt U. 2005. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*. 295(6-7): 357-371.
- 6 Eusébio A., Araújo C., Andrade M. & Duarte A. 2016. *Escherichia coli* nas infecções urinárias da comunidade: comensal ou patogênica? *Acta Urológica Portuguesa*. 33(2): 37-42.
- 7 Ewers C., Li G., Wilking H., Kiessling S., Alt K., Antão E.M., Laternus C., Diehl I., Glodde S., Homeier T., Böhnke U., Steinrück H., Philipp H.C. & Wieler L.H. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*. 297(3): 163-176.
- 8 Ferreira A.J.P. & Knöbl T. 2009. Colibacilose. In: Berchieri Junior A., Silva E.N., Di Fábio J., Sesti L. & Zuanaze M.A.F. (Eds). *Doença das Aves*. 2.ed. Campinas: FACTA, pp.457-471.
- 9 Johnson J.R. & Russo T.A. 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*. 295(6-7): 383-404.
- 10 Lee M.D., Nolan L.K. & Dufour-Zavala L. 2008. Colibacillosis. In: Dufour-Zavala L. (Ed). *A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens*. 5th edn. Athens: American Association of Avian Pathologists, pp.10-11.
- 11 Mobley H.L.T. & Alteri C.J. 2015. Development of a Vaccine against *Escherichia coli* Urinary Tract Infections. *Pathogens*. 5(1): 1-8.
- 12 Moulin-Schouleur M., Schouler C., Tailliez P., Kao M.R., Bree A., Germon P., Oswald E., Mainil J., Blanco M. & Blanco J. 2006. Common Virulence Factors and Genetic Relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* Isolates of Human and Avian Origin. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(10): 3484-3492.
- 13 Nakazato G., Campos T.A., Stehling G., Brocchi M. & Silveira W.D. 2009. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(7): 479-486.
- 14 Oliveira S.J. 2012. *Guia Bacteriológico Prático - Microbiologia Veterinária*. 3.ed. Canoas: ULBRA, 260 p.
- 15 Peer F.U., Ansari M.M., Gani I.A. & Willayat M.M. 2013. Evaluation of inoculation route in the pathogenicity of *Escherichia coli* strains in broiler chicks. *Research Journal for Veterinary Practitioners*. 1(2): 18-19.
- 16 Picard B., Garcia J.S., Gouriou S., Duriez P., Brahimi N., Bingen E., Elion J. & Denamur E. 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity*. 67(2): 546-553.
- 17 Pourbakhsh S.A., Boulianne M., Martineau-Doizé B., Dozois C.M., Desautels C. & Fairbrother J.M. 1997. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Diseases*. 41(1): 221-233.
- 18 Rodriguez-Siek K.E., Giddings C.W., Doetkott C., Johnson T.J., Fakhr M.K. & Nolan L.K. 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*. 151(6): 2097-2110.
- 19 Sabaté M., Moreno E., Pérez T., Andreu A. & Prats G. 2006. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. 12(9): 880-886.

- 20 Souza G.F., Rocha S.L.S., Furian T.Q., Borges K.A., Salle F.O., Moraes L.B., Moraes H.L.S & Salle C.T.P. 2016.** Classification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* by a Novel Pathogenicity Index Based on an Animal Model. *Acta Scientiae Veterinariae*. 44: 1347.
- 21 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.
- 22 Zhao L., Gao S., Huan H.C., Xu X.J., zhu X.P., Yang W., Gao Q.Q. & Liu X.F. 2009.** Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiology*. 155: 1634-1644.

