

ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) ISOLADAS DE PSITACÍDEOS.

TEREZINHA KNÖBL¹;
MÁRCIA CRISTINA MENÃO¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade do Grande ABC – Santo André, SP, Brasil.
E-mail: tknobl@fmu.br

1. INTRODUÇÃO

A microbiota normal dos psitacídeos é composta em sua maioria ou exclusivamente por bactérias Gram-positivas (Hofer, 1997). Muitos autores sugerem que toda bactéria Gram-negativa é um microrganismo não desejável no intestino dos psitacídeos e deve ser considerada como um patógeno (Mattes et al., 2005; Marietto-Gonçalves et al., 2007; Knöbl et al., 2009).

Escherichia coli enteropatogênicas (EPEC) são patógenos importantes das diarreias infantis em países em desenvolvimento e têm sido isoladas do homem e de animais domésticos (Goffaux et al., 2000; Nakazato et al., 2004; Gladys, 2005). Os efeitos patológicos resultam da adesão íntima na mucosa intestinal, desencadeando uma lesão denominada *attaching-effacing* (AE). A habilidade de induzir a lesão AE é mediada pela expressão de cerca de 40 genes bacterianos organizados em uma “ilha de patogenicidade”, conhecida como *Locus Enterocyte Effacement* (LEE) (Wales, Woodward, 2004).

Embora não seja essencial no desenvolvimento de lesões AE, uma fímbria denominada *bundle-forming pili* (BFP) codificada pelo plasmídeo EAF de *Escherichia coli* promove uma aderência localizada da bactéria nas células epiteliais, facilitando a ocorrência de lesões. Aquelas cepas de EPEC que possuem o plasmídeo são designadas EPEC típicas, e aquelas que perderam o plasmídeo são denominadas de EPEC atípicas (Carvalho et al., 2003).

Os humanos são os principais reservatórios de EPEC típicas, enquanto as EPEC atípicas têm sido associadas aos animais domésticos (bovinos, ovinos, caprinos, cães, gatos, suínos e galinhas) (Gladys, 2005). Recentemente, alguns sorotipos de EPEC atípicas têm sido descritos em animais selvagens (Carvalho et al., 2003; Hernandez et al., 2007). O impacto de patógenos antropogênicos para animais selvagens e o risco zoonótico potencial implicado no contato animal-humano é desconhecido. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de EPEC típica e atípica em psitacídeos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras de *E. coli*

Este estudo foi conduzido com 80 suabes de fezes frescas, coletadas de psitacídeos no Estado de São Paulo, Brasil, durante dois anos consecutivos (2006 a 2008).

Métodos padrões bacteriológicos de isolamento e identificação de *Escherichia coli* foram empregados (Bangert et al., 1988). Todos os isolados foram estocados a -70°C em caldo de infusão cérebro e coração (BHI) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) com adição de 15% de glicerol após a incubação.

2.2 PCR

A sequência de oligonucleotídeos que foi utilizada para detectar a presença de genes, o tamanho dos fragmentos e a literatura relevante estão ilustrados na Tabela 1.

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Boom et al (1990). A mistura de amplificação era constituída por 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (água/vol) gelatina, 200 µM de cada um dos quatro deoxynucleosídeos trifosfatos, pares de primers, e 0.5 U de Taq DNA polimerase em um volume final de 25 µl. Os

produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1.5% e examinados após a coloração com brometo de etídio. O marcador de peso molecular utilizado foi de 100-bp. Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados para a detecção de EPEC por PCR, tamanho dos fragmentos e referências.

Gene	Pares de Oligonucleotídeos (5'-3')	Fragmento (bp)	Referência
<i>eaeA</i>	ACG TTG CAG CAT GGG TAA CTC GAT CGG CAA CAG TTT CAC CTG	815	Gannon et al., 1993
<i>EAF</i>	CAG GGT AAA AGA AAG ATG ATA A TAT GGG GAC CAT GTA TTA TCA	397	Franke et al., 1994

2.3 Determinação de Sorogrupos

As amostras positivas na PCR foram sorotipadas pelo método descrito por Guinée et al. (1981) com todos os anti-soros O disponíveis (O1 a O185). Os anti-soros foram obtidos e adsorvidos por reações cruzadas com antígenos correspondentes para remoção de aglutininas inespecíficas.

3. RESULTADOS

Vinte e quatro cepas (30%) foram isoladas de 80 amostras, mas apenas dois isolados foram positivos para o gene *eae*. Estes isolados pertenciam aos sorogrupos O128 e O76 e foram negativos quando testados para a presença dos genes que codificam o EAF.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisados papagaios verdadeiros sem manifestações clínicas de diarreia. Cepas de *E. coli* foram isoladas de 24/80 (30%) amostras fecais coletadas de papagaios silvestres.

É bastante difícil diferenciar as cepas patogênicas e não patogênicas, pois *E. coli* é uma bactéria oportunista secundária nas aves, associada ao estresse, má nutrição, falha de higiene e hipovitaminose A. O potencial de patogenicidade de várias cepas de *E. coli* pode ser determinado por diferentes testes, como os ensaios fenotípicos com Vermelho Congo (Styles and Flammer, 1991), sorotipagem (Schremmer et al, 1999), e ensaios genotípicos (Knöbl et al., 2001; Pakpinyo et al., 2002). A Reação em Cadeia pela ação da Polimerase (PCR) é o método molecular mais rápido e sensível de determinar as propriedades de virulência de *E. coli*. Neste estudo a PCR detectou duas cepas *eae* + (8,3%). Nakazato et al. (2004) demonstraram o mesmo percentual de positividade (8,3%) em 36 cães (sem diarreia) na região de Campinas e na cidade de São Paulo (Brasil).

Hernandez et al. (2007) relataram a ocorrência de EPEC atípica em focas da antártica (*Arctocephalus gazelle*). Os autores discutiram a preocupação sobre a introdução de patógenos perigosos na Antártica, pela atividade humana.

Schremmer et al. (1999) examinaram isolados de *E. coli* de psittaciformes e enfatizaram a presença de sete cepas pertencentes aos sorovares O63:H10, O110:H6, O131:H-, O153:H10 e ONT:H6 que eram positivas para o gene *eae*, das quais quatro também eram positivas para o gene *bfpA*. Os autores concluíram que a EPEC deve ser considerada como um agente de potencial patogênico para os psitacídeos, que podem ser um reservatório de infecções humanas por EPEC. Do mesmo modo, em nosso estudo dois isolados dos sorogrupos O128 e O76 foram positivos para o gene *eaeA*, mas estes foram considerados como *E. coli* enteropatogênica atípica (aEPEC), um patotipo associado à diarreias caracterizadas pela ausência da região EAF.

Em conclusão, nossos resultados mostraram que sorotipos de EPEC atípicas estavam presentes entre os psitacídeos do Brasil. Estudos epidemiológicos futuros são necessários para esclarecer a patogenia desta bactéria em aves silvestres e os riscos implicados nesta zoonose.

Agradecimentos. FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – processo 2005/57500-9).

REFERÊNCIAS

BANGERT, R.L.; CHO, B.R.; WIDDERS, P.R.; STRAUBER, E.H.; WARD, A.C.S. A survey of aerobic bacteria and fungi in the healthy psittacine birds. **Avian Disease**, v.32, p.46-52, 1988.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and Simple Method for purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p.495-503, 1990.

CARVALHO, M.V.; GYLES, C.L.; ZIEBEL, K.; RIBEIRO, M.A.; CATÃO-DIAS, J.L.; SINHORINI, I.L.; OTMAN, J.; KELLER, R.; TRABULSI, L.R.; CASTRO, A.F.P. Characterization of Monkey Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from Neotropical nonhuman primates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1225-1234, 2003.

FRANKE, J.; FRANKE, S.; SCHMIDT, H.; SCHWARZKOPF, A.; WIELER, L.H.; BALJER, G.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.10, p.2460-2463, 1994.

GANNON, V.P.J.; RASHED, M.; KING, R.K.; GOSTEYN, T.E.J. Detection and characterization of eae gene of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* using Polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.5, p.1268-1274, 1993.

GLADYS, K. S. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary Microbiology**, v.106, p.87-9, 2005.

GOUFAUX, B.C.; JANSSEN, L.; MAINIL, J. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. **Research in Microbiology**, v.151, n.10, p.865-871, 2000.

GUINÉE, P.A.; JANSEN, W.H.; WADSTRÖM, T.; SELLWOOD, R. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhea in piglets and calves. **Current Topics in Veterinary Animal Science**, v.13, p.126–162, 1981.

HERNANDEZ, J.; PRADO, V.; TORRES, D.; WALDENSTRÖM, J.; HAEMIG, P.D.; OLSEN, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Antarctic fur seals *Arctocephalus gazella*. **Polar Biology**, v.30, p.1227-1229, 2007.

HOEFER, H.L. Diseases of the gastrointestinal tract. In: ALTMAN, R.B.; CLUBB, S.L.; DORESTEIN, G.M.; Qusenbery, K (Eds.), **Avian Medicine and Surgery**, Philadelphia: Saunders Company, pp.419-453, 1997.

KNÖBL, T.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; VIEIRA, M.A.; FERREIRA, C.S.; FERREIARA

A.J. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. **Veterinary Microbiology**, v.2283, p.71-80, 2001.

KNÖBL, T., GODOY, S.N., MATUSHIMA, E.R., GUIMARÃES, M.B., FERREIARA A.J. Caracterização molecular de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 54-60, 2009.

MARIETTO-GONÇALVES, G.A.; LIMA, E.T.; SEQUEIRA, J.L.; ANDREATTI FILHO, R.L. Coliseptisemia em papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.1, p.56-60, 2007.

MATTES, B.R.; CONSIGLIO, S.A.S.; ALMEIDA, B.Z.; GUIDO, M.C.; ORSI, R.B.; SILVA, R.M.; COSTA, A.; FERREIRA, A.J.P.; KNÖBL, T. Influência da biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psitacídeos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n.1, p. 13-16, 2005.

NAKAZATO, G.; GYLES, C.; ZIEBELL, K. ; KELLER, R.; TRABULSI, L.R.; GOMES, T.A.T.; IRINO, K.; DA SILVEIRA, W.D.; DE CASTRO, P. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Veterinary Microbiology**, v.101, p. 269-277, 2004.

PAKPINYO, S., LEY, D.H., BARNES, J.P., VAILLANCOURT, J.P., GUY, J.S. Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in naturally occurring cases of poult enteritis-mortality syndrome. **Avian Diseases**, v.46, p.360-369, 2002.

SCHREMMER, C.; LOHR, J.E.; WASTLHUBER, U.; KÖSTERS, J.; RAVELSHOFER, K.; STEINRÜCK, H.; WIELER, L.H. Enteropathogenic *Escherichia coli* in psittaciformes. **Avian Pathology**, v.28, p.349-354, 1999.

STYLES, D.K.; FLAMMER, K. Congo red binding of *Escherichia coli* isolated from the cloacae of psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 35, p.46-48, 1991.

WALES, A.D.; WOODWARD, G.R. Attaching-effacing bacteria in animals. **Journal of Comparative Pathology**, v.132., p. 1-26, 2005.

TEREZINHA KNÖBL¹; MÁRCIA CRISTINA MENÃO¹

¹ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade do Grande ABC - SP, Brazil.

*Corresponding author. Phone: +55-11-9747-2501 *E-mail* address: tknobl@fmu.br