ROSELY GIOIA MARTINS DI CHIACCHIO

**Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli*
diarreiogênicas isoladas de psitacídeos de pequeno porte criados
como “pets”: análise dos riscos zoonóticos.**

São Paulo
2016

ROSELY GIOIA MARTINS DI CHIACCHIO

**Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli*
diarreiogênicas isoladas de psitacídeos de pequeno porte criados
como “pets”: análise dos riscos zoonóticos.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de concentração
Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Profa. Dra. Silvana Lima Gorniak

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3441
FMVZ

Gioia-Di Chiacchio, Rosely Martins

Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* diarreiogênicas isoladas de psitacídeos de pequeno porte criados como "pets": análise dos riscos zoonóticos. -- 2016. 135 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Lima Gorniak.

1. *Escherichia coli*. 2. EPEC. 3. STEC. 4. Psitacídeos. 5. Zoonoses. I. Título.

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) isoladas de psitacídeos de pequeno porte criados como "pets": análise dos riscos zoonóticos.", protocolada sob o CEUA nº 7423290414, sob a responsabilidade de **Silvana Lima Górnaiak e equipe; Rosely Gioia Martins Di Chiacchio; Dra. Roxane Maria Fontes Piazza; Profa. Dra. Lílian Rose Marques de Sá ; Profa. Dra. Terezinha Knöbl** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 08/11/2016.

We certify that the proposal "Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* (EPEC) isolated from small psittacine birds housed as "pets": analysis of the zoonotic risk.", utilizing 16 Rabbits (16 males), protocol number CEUA 7423290414, under the responsibility of **Silvana Lima Górnaiak and team; Rosely Gioia Martins Di Chiacchio; Dra. Roxane Maria Fontes Piazza; Profa. Dra. Lílian Rose Marques de Sá ; Profa. Dra. Terezinha Knöbl** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/08/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2015** a **11/2015**

Área: **Patologia - Toxicologia Veterinária**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Coelhos**

sexo: **Machos**

idade: **a**

N: **16**

Linhagem: **Nova Zelândia**

Peso: **a**

Resumo: *Escherichia coli* é uma das principais causas de diarreia em seres humanos e aves. A patogênese da doença é decorrente do processo de aderência íntima da bactéria nos enterócitos mediado pela presença de intiminas e proteínas secretadas por um sistema de secreção do tipo 3. A literatura atual tem explorado a participação dos animais como reservatórios das amostras de EPEC atípicas. EPEC é um grupo de *E. coli* diarreio gênica que produz alterações características nas células intestinais, como a lesão A/E (attaching and effacing), mas não produzem toxinas shiga, enterotoxina termolábil ou termoestável, sendo conhecida como uma das principais causadoras de diarreia infantil. As cepas de EPEC ainda são classificadas em típicas quando abrigam o plasmídeo para o fator de aderência de EPEC (EAF), o qual codifica bfp (bundle forming pili), enquanto cepas atípicas são negativas para o gene bfp. A literatura atual tem explorado a participação de animais como reservatórios de EPEC atípica. O objetivo deste trabalho é caracterizar sob o ponto de vista genotípico e fenotípico amostras de *E. coli* isoladas de pequenos psitacídeos domiciliados e criados como animais de estimação, avaliando os riscos zoonóticos implicados na manutenção de aves em ambiente doméstico.

Local do experimento:

São Paulo, 09 de novembro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GIOIA-DI CHIACCHIO, Rosely Martins

Título: Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* diarreiogênicas isoladas de psitacídeos de pequeno porte criados como “pets”: análise dos riscos zoonóticos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Para meu amado pai Gíoiá Jr. (In memorian)

*Meu Deus, quanta saudáde!
Mas tenho certeza de que, mesmo
sentadinho na “nuvenzínha”, você está
orgulhoso e torcendo por mim .*

Te amo eternamente!

Para minha amada mãe Dínorah.

*Minha “loíra” linda!
Compartilhar e dividir com você é tudo!!!
Você sabe o quanto é importante para
mim essa conquista. Você me apoiou e esteve
ao meu lado sempre!*

Te amo hoje e sempre!!!

Para o meu “bem” querido e amado Nilton

Agora são 34 anos!

O amor continua, a comunhão também.

O respeito então, nem se fala...

Continuo a dedicar meus trabalhos a você!

Sem você, realmente, nada teria sido possível. Obrigada por existir, obrigada por estar ao meu lado.

Té amo, tudo e.....para sempre!!!

*Para meus filhos queridos e amados,
Niltinho – Sharon
Nana – Fábio*

*Minha família aumentou e agora são quatro filhos.
Deus continua a me abençoar... Tenho lindos filhos
que eu amo tanto! São verdadeiras jóias para mim!
Continuo tendo muito orgulho de vocês!
Vocês me deram “presentinhos” que sempre
agradeço!!!!*

Amo vocês!

*Para minhas netas (Fefa e Gígi)
neto (Rafinha) e o que estar por vir....*

*Não tem amor maior!
Alegría sem tamanho!
Enchem a minha casa de brilho e felicidade!
Não sei mais passar um dia sequer sem vocês!*

*Vocês estarão sempre no coração
da vovó Zoli (p/Fefa) e Zizili (p/Gígi).*

Para a minha grande amiga Terezinha Knöbl

São doze anos compartilhando pesquisas, congressos, conhecimentos, esforços, conquistas além de terraços, varandas, salas em reforma, músicas (“ilumina”), risadas (e quantas) e muitas vezes choro..... Você soube acolher e entender que o meu interesse científico superava qualquer barreira e qualquer dificuldade.

Sou grata pela sua vida! Sou grata por tudo o que você fez por mim!

Dedico do fundo do meu coração este trabalho a você!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES pela bolsa de doutorado e ao Departamento de Patologia Experimental e Comparada – VPT, FMVZ-USP pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Agradeço a Profa. Dra. Silvana Lima Gorniak, orientadora da minha formação profissional, sempre pela seriedade, pelo exemplo e por me oferecer a oportunidade e o estímulo necessário durante todo o período de pós-graduação. Agradeço também a confiança em mim depositada, sendo responsável pela realização de um grande sonho.

Agradeço a Profa. Dra. Terezinha Knöbl pela preciosa orientação e contribuição na elaboração deste trabalho.

Agradeço a Profa. Dra. Lilian Rose Marques de Sá que possibilitou a realização dos exames histológicos no Departamento de Patologia Experimental e Comparada – VPT, FMVZ-USP e que me recebeu e apoiou com entusiasmo e amizade.

Agradeço a Profa. Dra. Andrea Micke Moreno que possibilitou a realização do exame AFLP no Departamento de Medicina Veterinária preventiva e Saúde Animal – VPS, FMVZ-USP e que me recebeu e apoiou com muito carinho.

Agradeço o Instituto Butantan em especial ao senhor Waldir Pereira Elias Jr e a senhora Roxane Maria Fontes Piazza, por me receberem de forma tão acolhedora no Laboratório de Bacteriologia e por permitir a elaboração de testes fenotípicos e genotípicos nesta instituição.

Agradeço a pesquisadora Marcia Regina Franzolin, do Instituto Butantan – Laboratório de Bacteriologia pelo auxílio, amizade, troca de experiências, realização e identificação do material microbiológico deste estudo.

Agradeço a pesquisadora Cecília Mari Abe, do Instituto Butantan – Laboratório de Bacteriologia pela colaboração grandiosa nos exames de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

Agradeço a Profa. Dra. Beatriz Ernestina Cabilio Guth, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo, pela colaboração nas pesquisas de alguns marcadores de virulência.

Agradeço o senhor Luís Fernando dos Santos – pesquisador Científico do Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Centro de Bacteriologia - Instituto Adolfo Lutz, pela preciosa contribuição e elaboração da sorologia.

Agradeço o Prof. Dr. Fernando José Benesi, chefe do Serviço de Clínica de bovinos e pequenos ruminantes – HOVET – FMVZ-USP, pela coleta de sangue para a realização do testes de hemolisina.

Agradeço ainda aos meus colegas de bancada do Instituto Butantam – Laboratório de Bacteriologia, Fernando, Camila, Bruno, Danielle, Matilde e tantos outros pelo carinho com que me receberam e pela ajuda preciosa na elaboração dos testes fenotípicos e genótipos.

Agradeço aos meus amigos queridos Marcos, Gabriela, Yame, Letícia, Mirela do Laboratório de Medicina Aviária do Departamento de Patologia Experimental e Comparada – VPT, FMVZ-USP, pelo carinho, amizade e importante ajuda nos testes genotípicos e no teste de alça ligada em coelho.

Agradeço aos colegas Claudio e Luciano, técnicos do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Experimental e Comparada – VPT – FMVZ-USP, pela ajuda e pelo preparo do material histopatológico utilizado na pesquisa.

Agradeço a senhora Mônica pela contribuição na versão do “abstract”.

Agradeço a minha querida Marina Knöbl, pela colaboração carinhosa na revisão ortográfica deste trabalho.

Agradeço os meus irmãos, Rubens, Rosana e meu cunhado Nelson pelo amor incondicional, pela paciência e por terem acreditado em mim esse tempo todo.

Agradeço os meus sobrinhos Mariana, Marcelo, Rubinho, Thiago e João Pedro, tão queridos e amados.

Agradeço os meus amados sogros, Nelson (*in memorian*) e Therezita, por acreditarem em mim e fazerem parte da minha vida.

E... agradeço a todos os meus amigos que por ventura eu deixei de mencionar, mas não menos importantes.

*...Nasceu a rosa que plantei, primeira
entre todas as rosas prediletas,
brotou sanguínea e quente da roseira
como o sonho de todos os poetas...*

Gíóia Jr.

RESUMO

GIOIA-DI CHIACCHIO, R. M. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* diarreiogênicas isoladas de psitacídeos de pequeno porte criados como “pets”**: análise dos riscos zoonóticos. [Phenotypic and genetic characterization of diarrheogenic *Escherichia coli* isolated from small parrot created as pets: analysis of zoonotic risks.]. 2016. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Dentre os psitacídeos criados como *pets*, destacam-se as calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), os periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) e agapornis (*Agapornis* spp.). Os benefícios decorrentes da presença destas aves em ambiente doméstico são reconhecidos, porém pouco se conhece sobre os riscos de transmissão de zoonoses. *E. coli* pode ser isolada em diversos sítios do corpo humano e animal. Alguns sorotipos são considerados patogênicos e, nestes casos, a infecção pode estar associada à ocorrência de diversas manifestações clínicas. O presente estudo tem como objetivo a caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* diarreiogênicas isoladas de pequenos psitacídeos mantidos como pets. 171 amostras de fezes de aves domiciliadas na cidade de São Paulo foram colhidas com auxílio de suabes estéreis, sendo 67 de calopsitas, 59 de periquitos australianos e 45 agapornis. Das 171 amostras, foram identificadas 42 colônias de *Escherichia coli* (22 de calopsitas, 10 de periquitos e 10 de agapornis), submetidas à extração de DNA e pesquisa dos genes *eae*, *bfpA*, *stx1*, *stx2*, LT, ST e *aggR*; *aaiA*; *aatA*; *aaiG* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os resultados apontaram positividade em dez isolados: *eae*⁺, *bfpA*⁺, *Stx2f*⁺ de três calopsitas e cinco periquitos australianos (8/10); ST de uma calopsita (1/10) e *eae*⁺ de um periquito australiano (1/10). As oito estirpes de STEC/tEPEC foram classificadas como O137:HNM e nenhuma das estirpes exibiu um perfil de multirresistência. Apenas um isolado foi positivo para formação de biofilme (DO de 0,064), sendo classificado como fracamente aderente. A análise filogenética dos 4 grupos de Clermont et al. (2013) classificou três estirpes como B2, duas como F, e uma como Clado II. Duas estirpes foram classificadas como “não tipável”. Os resultados para o AFLP foram: 7/8 estirpes (três de calopsitas e quatro de periquitos) foram agrupadas em um mesmo *cluster*, apresentando 90-100% de similaridade. Os resultados do sequenciamento de fragmentos internos de genes house-keeping - Multi-locus Sequence Typing (MLST) revelou que as oito estirpes pertenciam ao ST 3072. Neste estudo, nenhuma das estirpes apresentou atividade hemolítica, mas produziram toxinas *in vitro*. Aderiram *in vitro* em células HeLa e causaram lesões A/E em modelo de alça intestinal de coelho. As estirpes induziram processo inflamatório e aumento de muco intestinal. Os dados deste trabalho revelaram o potencial zoonótico dos híbridos STEC/tEPEC sorogrupo O137:HNM; ST 3072 isolados de psitacídeos de pequeno porte criados como “pet”.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. EPEC. STEC. Psitacídeos. Zoonoses.

ABSTRACT

GIOIA-DI CHIACCHIO, R. M. **Phenotypic and genetic characterization of diarrheogenic *Escherichia coli* isolated from small parrot created as pets: analysis of zoonotic risks.** [Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* diarreogênicas isoladas de psitacídeos de pequeno porte criados como “pets”: análise dos riscos zoonóticos.]. 2016. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Among the parrots (psittacidae family) kept as pets, the cockatiels (*Nymphicus hollandicus*), budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and lovebirds (*Lovebirds* spp.) stand out. Although the benefits from the presence of these birds in a household environment are acknowledged, little is known about the risks of transmission of zoonoses. *E. coli* can be isolated in various sites of the human and animal body. Some serotypes are considered as pathogenic, and in such cases, the infection may be associated with the occurrence of several clinical manifestations. The aim of the present study is to characterize, phenotypically and genotypically, diarrheogenic *Escherichia coli*, isolated from the small parrots kept as pets. One hundred and seventy-one fecal samples of birds living in households in the city of São Paulo were collected with the aid of sterile swabs, with 67 being from cockatiels, 59 from budgerigars, and 45 from lovebirds. From the 171 samples, 42 (22 from cockatiels, 10 from budgerigars and 10 from lovebirds) *Escherichia coli* colonies were identified, which had their DNA extracted, and the *eae*, *bfpA*, *stx1*, *stx2*, LT, ST and aggR; *aaiA*; *aatA*; *aaiG* genes were investigated, through Polymerase Chain Reaction (PCR). The results indicated positivity in ten isolates: *eae*⁺, *bfpA*⁺, *Stx2f*⁺ from three cockatiels and five budgerigars (8/10), ST from one cockatiel (1/10), and *eae*⁺ from one budgerigar (1/10). The eight STEC/tEPEC lineages were classified as O137:HNM, and none of the lineages showed a multiresistance antibiotic profile. Only one isolate was positive for biofilm formation (DO, 0.064), which was classified as weakly adherent. The phylogenetic analysis of the 4 groups by Clermont et al. (2013) classified three lineages as B2, two as F, and one as Clade II. Two lineages were classified as “non-typeable.” The results for AFLP were: 7/8 lineages (three of cockatiels and four of budgerigars) were clustered together, with 90-100% of similarity being observed. The results of the internal fragment sequencing of house-keeping genes – Multi-locus Sequence Typing (MLST) revealed that the eight lineages belonged in to ST 3072. In this study, although none of the lineages showed hemolytic activity, they produced toxins *in vitro*. They adhered, *in vitro*, to HeLa cells and caused A/E lesions in an intestinal loop model of rabbits. The lineages induced an inflammatory process and an increase of intestinal mucus. This study data revealed the zoonotic potential of STEC/tEPEC hybrids, O137:HNM; ST 3072 serogroup, isolated from small-sized parrots kept as pets.

Keywords: *Escherichia coli*. EPEC. STEC. Psittacidae. Zoonoses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Microscopia ótica representando os diferentes padrões de aderência exibidos por estirpes STEC/EPEC em células HeLa.....	93
Figura 2 –	(A) Intestino delgado com segmentos ligados de 5 cm de comprimento, separados por inter-alças de 3 cm de comprimento. Posteriormente inoculado em cada alça 1 mL da solução de amostra. A fotografia do painel A, demonstra aumento de fluido > 1 mL. No painel (B), excisão de uma alça infectada com bactéria, revelando secreção de natureza mucóide. As fotografias são representativas de uma amostra (CA12).....	97
Figura 3 –	Intestino delgado de coelho: (A) e (B) Controle positivo (C+): O55:H7 – visualizados em microscopia ótica em aumento de 10X e 40X respectivamente, corados por Giensa. (C) Microscopia de varredura e (D) Microscopia de transmissão.....	99
Figura 4 –	Intestino delgado de coelho: (A) e (B) Controle negativo (C-): DH10-B – visualizados em microscopia ótica em aumento de 10X e 40X respectivamente, corados por Giensa.(C) Microscopia de varredura e (D) Microscopia de transmissão.....	100
Figura 5 –	Intestino delgado de coelho: (A e B) amostra CA12 – visualizados em microscopia ótica em aumento de 10X e 40X , corados por Giensa. (B) Microscopia de varredura e (C) Microscopia de transmissão.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Fatores de virulência pesquisados pela reação em cadeia pela polimerase para identificação de <i>E. coli</i> diarreiogênicas de relevância epidemiológica: EPEC, STEC, ETEC e EAEC.....	49
Tabela 2 –	Descrição dos genes utilizados para a classificação de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> , sequência dos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado.....	52
Tabela 3 –	Citotoxicidade dos estirpes de STEC/EPEC e atividade neutralizante de anticorpos policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2.....	95
Tabela 4 –	Avaliação macroscópica de alça intestinal do delgado quanto à presença de acúmulo de líquido e muco.....	97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Identificação das aves analisadas por espécies.....	46
Quadro 2 –	Sítio de restrição da enzima <i>HindIII</i> , adaptadores e sequência de <i>primers</i> para tipagem de <i>Escherichia coli</i> através da AFLP.....	53
Quadro 3 –	Percentual de detecção de positividade das Enterobactérias das espécies avaliadas e resultados positivos para <i>E. coli</i> obtidos a partir de cultura de excretas cloacais de Calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>), periquito australiano (<i>Melopsittacus undulatus</i>) e agapornis (<i>Agapornis</i> spp) de diferentes locais de manutenção.	56
Quadro 4 –	Fatores de virulência pesquisados pela reação em cadeia pela polimerase para identificação de <i>E. coli</i> diarrreogênicas de relevância epidemiológica: EPEC, STEC, ETEC e EAEC.....	57
Quadro 5 –	Dendograma gerado a partir da análise de AFLP de isolados de <i>E. coli</i> isoladas de psitacídeos.....	60
Quadro 6 –	Sequência de <i>primers</i> utilizados para subtipagem dos genes que codificam a toxina STX-2.....	83
Quadro 7 –	Iniciadores para a amplificação por PCR de fragmentos internos de genes.....	84
Quadro 8 –	Genes do operon BFP das estirpes de <i>E. coli</i>	91
Quadro 9 –	Resultados do ensaio de aderência em 3 e 6h, representando os diferentes padrões de aderência exibidos por estirpes STEC / EPEC em células HeLa.....	92
Quadro 10 –	Descrição histopatológica de fragmentos de alça intestinal do delgado corados por Giensa e visualizados em microscopia ótica em aumento de 10X e 40X.....	98

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Resultado dos ensaios de formação de biofilme de <i>E. coli</i> isoladas de psitacideos <i>pet</i>	59
Gráfico 2 –	Citotoxicidade das estirpes STEC/EPEC e atividade neutralizante de anticorpos policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2. A morte de 50% ou mais das células (abaixo da linha pontilhada) foi considerado como indicativo de alta citotoxicidade.....	94

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	24
2	REVISÃO DE LITERATURA GERAL.....	27
2.1	ANIMAIS.....	27
2.2	FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEA.....	29
2.1.1	Características morfológicas e epidemiológicas da <i>Escherichia coli</i>.....	29
2.2.2	Estrutura antigênica e fatores de virulência.....	31
2.2.3	Patogênese.....	32
2.2.4	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica.....	34
2.2.4.1	<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	35
2.2.4.2	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC) e subtipo entero- hemorrágica (EHEC).....	38
2.2.4.3	<i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETECs).....	40
2.2.4.4	<i>E. coli</i> enteroagregativa (EaggEC).....	41
2.2.4.5	<i>E. coli</i> enteroinvasora (EIEC).....	42
2.2.4.6	<i>E. coli</i> aderente difusamente (DAEC).....	43
3	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE <i>E. coli</i> DIARREIOGÊNICAS ISOLADAS DE PSITACÍDEOS DE PEQUENO PORTE CRIADOS COMO <i>PETS</i>.....	45
3.1	INTRODUÇÃO.....	45
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	46

3.2.1	Local.....	46
3.2.2	Animais e coleta de amostras.....	46
3.2.3	Amostras bacterianas.....	47
3.2.4	Determinação dos fatores de virulência através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR).....	48
3.2.5	Determinação de sorogrupo.....	49
3.2.6	Perfil de resistência.....	50
3.2.7	Ensaio de formação de biofilme.....	51
3.2.8	Determinação dos grupos filogenéticos.....	52
3.2.9	Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).....	52
3.2.10	Amplificação e sequenciamento dos genes <i>eae</i> , <i>bfpA</i> e <i>stx</i> ...	54
3.3	RESULTADOS.....	56
3.3.1	Amostras bacterianas.....	56
3.3.2	Determinação dos fatores de virulência através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR).....	57
3.3.3	Amplificação e sequenciamento dos genes <i>eae</i> , <i>bfpA</i> e <i>stx</i> ...	57
3.3.4	Determinação do sorogrupo.....	58
3.3.5	Perfil de resistência.....	58
3.3.6	Ensaio de formação de biofilme.....	58
3.3.7	Determinação dos grupos filogenéticos.....	59
3.4	DISCUSSÃO.....	61

3.5	CONCLUSÕES.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
4	CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES HÍBRIDAS DE STEC E EPEC TÍPICA ISOLADAS DE PSITACÍDEOS DE PEQUENO PORTE CRIADOS COMO “PET”	80
4.1	INTRODUÇÃO.....	80
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	82
4.2.1	Amostras bacterianas	82
4.2.2	Subtipagem da toxina Shiga 2	82
4.2.3	Amplificação e sequenciamento dos genes <i>perA</i>, <i>perB</i>, <i>perC</i>, <i>bfpA</i>, <i>bfpB</i>, <i>bfpDF</i>, <i>bfpIL</i> e DEL	83
4.2.4	Sequenciamento de fragmentos internos de genes <i>housekeeping</i> - <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	84
4.2.5	Determinação de alfa-hemolisina	85
4.2.6	Cultura celular e ensaio de aderência <i>in vitro</i> em células HeLa	86
4.2.7	Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> em células Vero	87
4.2.8	Teste de alça ligada em coelhos e histológico	88
4.2.9	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	89
4.2.10	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	90
4.3	RESULTADOS.....	91
4.3.1	Subtipagem da toxina Shiga 2	91

4.3.2	Amplificação e sequenciamento dos genes <i>perA</i>, <i>perB</i>, <i>perC</i>, <i>bfpA</i>, <i>bfpB</i>, <i>bfpDF</i>, <i>bfpIL</i> e DEL.....	91
4.3.3	Sequenciamento de fragmentos internos de genes housekeeping - Multi-locus Sequence Typing (MLST) e determinação de alfa hemolisina.....	92
4.3.4	Cultura celular e ensaio de aderência <i>in vitro</i> em células HeLa.....	92
4.3.5	Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> em células Vero.....	94
4.3.6	Teste de alça ligada em coelhos, histológico, MEV e MET....	97
4.4	DISCUSSÃO.....	102
4.5	CONCLUSÕES.....	108
	REFERÊNCIAS.....	109
	ANEXOS.....	113

1 INTRODUÇÃO GERAL

Não há documentação que registre em que momento da história os psitacídeos aparecem como animais de estimação (*pets*), mas a interação do homem com essas aves tornou-se cada vez mais comum, principalmente nos centros urbanos (GOULART, 2001; CAMPOS; ROSA, 2004). Embora os benefícios decorrentes da presença destas aves em ambiente doméstico seja reconhecido, pouco se conhece sobre os riscos de transmissão de zoonoses (GRESPLAN, 2010).

O esclarecimento da população sobre as doenças infecciosas, principalmente em países em desenvolvimento, é necessário, pois a divulgação escassa e insuficiente de programas educacionais permanentes contribui para a elevação de número de casos de enfermidades. Em relação às zoonoses, os ciclos deixam de considerar fatores socioeconômicos, culturais e comportamentais das populações humanas envolvidas (MENDES; LEITE, 2005).

Alguns gêneros pertencentes à família Enterobacteriaceae têm merecido atenção especial por estarem entre os patógenos mais isolados em microbiologia clínica, tendo como *habitat* natural o trato intestinal de seres humanos e animais (STROHL et al., 2004; SILVA; NEUFELD, 2006). Os bacilos Gram-negativos do gênero *Escherichia* são membros da microbiota intestinal dos mamíferos e da maioria das espécies de aves, sendo isolados em vários locais do meio ambiente (SILVA; NEUFELD, 2006; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008), podendo ou não desencadear sintomatologia clínica (FAIRBROTHER; NADEAU, 2006).

Escherichia coli (*E. coli*) é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa pertencente à família Enterobacteriaceae (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010). É o micro-organismo mais estudado em todo o mundo (SILVA; NEUFELD, 2006) e tem sido isolado em diversos sítios do corpo humano e animal, causando alguns tipos de afecções, como infecções urinárias e intestinais, pneumonias, meningites entre outras. Alguns sorotipos de *E. coli* são considerados patogênicos e, nestes casos, a infecção pode estar associada à ocorrência de diversas manifestações clínicas (SUSSMAN, 1997; BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010).

A colonização intestinal por *E. coli* em aves está associada ao processo inflamatório da mucosa intestinal, causando efeitos adversos sobre a digestão dos alimentos e absorção de nutrientes, aumentando a mortalidade dos filhotes (GO-

DOY; MATUSHIMA, 2010), além de óbito por septicemia em aves adultas (SAIDENBERG; KNÖBL, 2005).

E. coli é considerada um patógeno oportunista e alguns sorotipos são patogênicos. Entre os componentes relacionados à patogenicidade, destacam-se o lipopolissacardeo (LPS) e outros fatores de virulência bacteriana, presentes em regiões do cromossomo denominadas “ilhas de patogenicidade” (PAIs). A sorotipagem do agente identifica os antígenos O (antígeno somático), H (antígeno flagelar) e K (capsulares) (ARANDA et al., 2007).

E. coli foi dividida em dois grupos: as que causam diarreia e as relacionadas aos quadros de infecção extraintestinais, sendo importante a determinação dos patótipos de acordo com o mecanismo de ação bacteriana (ARANDA et al., 2007).

E. coli que causam diarreia foram classificadas em seis patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC) e enteroagregativa (EaggEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (SILVA; NEUFELD, 2006).

O patótipo EPEC é representado principalmente pelos sorogrupos O26, O39, O55, O86, O103, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O145, O157 e O158 e a ocorrência de diarreia se dá pela diminuição da absorção em função do padrão de aderência íntima da bactéria aos enterócitos, que resulta em uma lesão em forma de pedestal denominada “*attachment/effacement*” (HU; TORRES, 2015).

Segundo Croxen e Finlay (2010), os genes mais importantes da EPEC são *eae* (intimina) e adesina *bfp* (*bundle forming pili*), ambos relacionados com aderência íntima da bactéria ao enterócito, realizando alterações no citoesqueleto, formando lesão do tipo pedestal com perda de vilosidade. Quando os dois genes são encontrados na bactéria, esta é denominada EPEC típica (tEPEC), encontrada em 90% dos casos de infecções em humanos. A perda do plasmídeo EAE resulta no surgimento de estirpes classificadas como EPEC atípicas (aEPEC), sendo *eae* positivas e *bfp* negativas. Neste caso, os reservatórios podem incluir várias espécies de animais utilizados na produção de alimentos, como bovinos, ovinos, caprinos, suínos e aves (HERNANDES et al., 2009). Além disso, também foi descrita a detecção de aEPEC em animais domésticos (cão e gato), cavalo, veado e sagui (CARVALHO et al., 2003).

Muitas espécies de mamíferos e aves são consideradas reservatórios de STEC e o consumo de produtos de origem animal é o principal fator de risco para a

contaminação humana (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; MARTINS et al., 2015). Entre os fatores de virulência de STEC, destaca-se a produção de toxinas semelhantes a Shiga-like, Stx1 e Stx2, codificada pelos genes *stx1* e *stx2* (CHANDRAN; MAZUMDER, 2014). A toxina Stx2 parece ser mais tóxica em relação à Stx1, estando frequentemente associada à colite hemorrágica (CH) e à síndrome hemolítica-urêmica (SHU) (JORIS et al., 2013).

Nas aves, a ocorrência de STEC e EPEC tem sido detectada em gaivotas e pombos na Europa, Japão e Estados Unidos (CHANDRAN; MAZUMDER, 2014). Embora existam relatos em psitacídeos de grande porte (araras e papagaios) cativos (MATTES, et al., 2005) e de vida livre (SAIDENBERG et al., 2012), pouco se conhece sobre a prevalência dos agentes em psitacídeos de menor porte, criados como *pets*.

Calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e agapornis (*Agapornis* spp.) são as espécies exóticas mais comumente mantidas como *pets* no Brasil, possivelmente por serem aves dóceis, companheiras e possuírem uma plumagem colorida exuberante (GRESPLAN, 2010). Em centros urbanos, a criação destas aves vem se tornando frequente e a proximidade com seres humanos e outros animais de estimação pode facilitar a contaminação ambiental e a infecção por contato direto (MATTES, et al., 2005 ; GRESPLAN, 2010).

Em função do potencial zoonótico e da escassez de relatos sobre a prevalência de STEC e EPEC em aves cativas, o presente estudo tem como objetivo identificar a presença de *E. coli* diarreiogênicas em psitacídeos de pequeno porte criados como *pet*. No presente estudo, as estirpes serão caracterizadas meio de testes fenotípicos e genotípicos de modo a estabelecer um risco sanitário o potencial zoonótico dos isolados.

2 REVISÃO DE LITERATURA GERAL

2.1 ANIMAIS

A ordem Psittaciforme inclui mais de 80 gêneros dentre as famílias Psittacidae, Strigopidae e Cacatuidae, com mais de 360 espécies descritas (IOC World Bird List, 2016). A caloposita (*Nymphicus hollandicus*) é uma ave natural da Austrália, pertencente à família Cacatuidae, de um único gênero *Nymphicus*. Foi descrita pela primeira vez em 1792, porém somente em 1970 os primeiros exemplares chegaram ao Brasil. A facilidade de manutenção e reprodução em criatórios comerciais tornou esse animal popular, de baixo custo e fácil acesso (SICK, 1997).

O periquito australiano, originário da Austrália Central, é chamado popularmente de periquito comum (*Melopsittacus undulatus*) e pertence à família Psittacidae. É um animal de características nômades, de hábitos monogâmicos e que vive em bandos. Os primeiros registros foram relatados por dois naturalistas ingleses, George Shaw e Frederick Nodder, em 1805. Porém, somente em 1840 John Gould, um ornitólogo e naturalista inglês, levou alguns exemplares destas aves para a Europa (SICK, 1997).

Agapornis é uma palavra grega que significa “pássaros do amor” e essas aves têm como principal característica a monogamia, vivendo aos casais. Foram relatados em 1793, originários do continente africano e levados para a Europa (Espanha) em 1860 pelo pesquisador Hangenbeck. Na natureza, só são encontrados na coloração original verde. Todas as mutações foram adquiridas em cativeiro (ABEELLE, 2012).

A partir de 1850, os psitacídeos foram intensamente procurados como animais de companhia. Por serem de fácil domesticação – alguns são capazes de imitar sons humanos –, possuem notável inteligência e adaptam-se às gaiolas, essas aves passaram a ser comercializadas em larga escala, tornando-se alvo de um comércio predatório e ilegal (HARCOIURT-BROWN, 2010).

O interesse das pessoas por esses animais resultou num crescente número de criadores comerciais (FOTIN, 2005). Segundo Elizeire (2013), a mudança socioeconômica da população brasileira está intrinsecamente relacionada à expansão do

mercado *pet* observada nas últimas décadas. No Brasil, foi apresentado um crescimento de 16,4% no ano de 2012, movimentando R\$ 14,2 bilhões no país. Em resposta à crescente demanda por produtos e tratamentos para os animais, a indústria veterinária tem investido cada vez mais em tecnologia e pesquisa científica.

As aves podem albergar agentes transmissíveis para os seres humanos e o convívio próximo pode ser um grande fator de risco para a saúde pública (MATTES, et al., 2005 ; GRESPAN, 2010). Em seu *habitat* natural, as aves raramente têm contato com o solo e seu fornecimento de água vem das frutas ou algum depósito de chuva. Como consequência desse limitado contato e eventual acesso à água contaminada, sua microbiota é composta por uma reduzida presença de bactérias Gram-negativas, como por exemplo a *E. coli*, (MARIETTO-GONÇALVES, et al., 2011). A contaminação de ecossistemas aquáticos por micro-organismos fecais de fontes humana ou não humanas constituem uma ameaça significativa à saúde pública (MAZUMDER, 2014).

Segundo Godoy (2001) as infecções por enterobactérias estão entre as principais enfermidades bacterianas associadas à morte de aves. Quando submetidas a condições inadequadas de transporte, alimentação e higiene, as aves sofrem interferência em sua homeostase, tornando-se suscetíveis às infecções primárias e/ou secundárias (RASO et al., 2004). Esse desequilíbrio, proveniente do estresse e maus tratos ao longo do trajeto de captura em seu *habitat* natural até sua venda, proporciona condições ideais para a disseminação de bactérias Gram negativas, em especial as pertencentes à família Enterobacteriaceae, presentes no trato intestinal (SAIDENBERG; KNÖBL, 2005).

As zoonoses e as doenças transmissíveis comuns aos homens e aos animais continuam registrando altos níveis de incidência em todos os países, principalmente nos em desenvolvimento, causando uma significativa taxa de morbidade e mortalidade (ACHA; SZYFRES, 2001). É importante identificar os agentes etiológicos e o risco que representam para coleções de animais em cativeiro. Isso permite intervir sobre os fatores envolvidos, controle de enfermidades e a conservação das espécies e da saúde pública (GOMES, 2002).

2.2 FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEA

A família Enterobacteriaceae é composta por aproximadamente 44 gêneros e mais de 130 espécies, classificados com base na similaridade do DNA e características bioquímicas (STROHL et. al.; 2004). Plantas, solo, água, homem e animais fazem parte do seu *habitat* natural (TRABULSI; ALTERTUM, 2008).

Entre as enterobactérias mais envolvidas com os psitacídeos, destacam-se a *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., assim como as dos gêneros *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp. e *Enterobacter* spp. (STROHL et al., 2004; BERQUIERI JR, 2009).

2.2.1. Características morfológicas e epidemiológicas da *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* inclui as espécies *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergussonii*, *E. vulneris*, *E. albertii* e *E. hermannii*, sendo a *E. coli* a espécie mais frequentemente isolada (TRABULSI; ALTERTUM, 2008).

Escherichia coli foi descrita em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich, que notou sua alta prevalência na microbiota intestinal de crianças nas primeiras 24 horas após o nascimento, sendo alimentadas exclusivamente pelo leite materno. Foi primeiramente denominada *Bacterium coli commune* (ESCHERICH, 1885; CLEMENT et. al., 2012; D'ARI; SEZONOV, 2014). Em 1919, Aldo Castellani e Albert J. Chalmers deram uma nova denominação ao bacilo, em homenagem ao seu descobridor. O agente passou, então, a ser conhecido pelos microbiologistas como *Escherichia coli*, sendo selecionada como modelo para estudos de processos biológicos (KUHNERT et al., 2000; STROHL et. al.; 2004; D'ARI; SEZONOV, 2014). A variante mais utilizada em laboratório como organismo-modelo é um isolado não patogênico, denominado K12, isolado em 1922 a partir de fezes humanas. Essa amostra é mantida até os dias atuais, pela Universidade de Stanford, Califórnia (D'ARI; SEZONOV, 2014).

Por mais de 50 anos *Escherichia coli* foi considerada um micro-organismo comensal. No entanto, vários patótipos diarreiogênicos têm sido isolados em muitos

surtos, devido à contaminação da água (CHANDRAN; MAZUMDER, 2014). Atualmente, está bem estabelecida a etiologia nas infecções do trato digestório, urinário e nas septicemias (NATARO; KAPER, 1998; MAZUMDER, 2014).

E. coli comensal difere evolutivamente da *E. coli* patogênica e não apresenta, em seu genoma, os genes que codificam os fatores de virulência presentes nos diferentes patótipos (FOCACCIA, 2005). Ao longo do tempo, estirpes de *E. coli* patogênicas vêm adquirindo fatores de virulência específicos (KAPER et al., 2004; FERREIRA et al., 2009), conferindo um aumento na habilidade de se adaptar a novos nichos causando um amplo espectro de doenças em indivíduos saudáveis (KAPER et al., 2004). Cada indivíduo carrega em sua microbiota intestinal uma população de *E. coli*. Portanto, a bactéria será encontrada em esgoto, permitindo, assim, sua propagação para o meio ambiente e outros hospedeiros animais (D'ARI; SEZONOV, 2014).

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), 88% dos casos de diarreia que ocorrem nos países em desenvolvimento são transmitidas por meio de água contaminada (WHO, 2004). Desde 1912, *E. coli* é utilizada como indicador de contaminação fecal na água e em alimentos, por pertencer à microbiota normal do trato entérico do homem (NATARO; KAPER, 1998; STROHL et al., 2004; RODRIGUES et al., 2008; CLEMENTS, 2012; CDC, 2014) e em algumas espécies de aves (TRABULSI; ALTERTUM, 2008; CROXEN; FINLAY, 2010). Pode-se encontrar mais de 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de fezes. Geralmente, permanece inofensiva no lúmen intestinal. Entretanto, em hospedeiros debilitados, imunossuprimidos, ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas, estirpes de *E. coli* não patogênica pode causar infecção (KAPER et al., 2004).

Escherichia coli tem sido apontada como uma das principais enfermidades bacterianas associadas ao óbito por septicemia em aves (SAIDENBERG; KNÖBL, 2005). Segundo Guimarães (2006), a colonização intestinal por *E. coli* em aves é resultado da contaminação de alimentos e água. Estirpes enteropatogênicas são comumente isoladas de aves com diarreia e ausentes nas aves saudáveis. Porém, em ambiente adequado e mantendo uma alimentação saudável, as aves podem albergar bactérias patogênicas sem desenvolver doença (KARIUKI et al., 2002).

E. coli é um bacilo com coloração Gram-negativa, não esporulado e anaeróbio facultativo, pois possui metabolismo respiratório e fermentativo, sendo capaz de fermentar, com produção de ácido e gás, glicose, lactose, maltose, manose, manitol,

xilose, glicerol, ramanose, sorbitol e arabinose (ANDREATTI FILHO, 2007). Também é caracterizado por suas propriedades bioquímicas: positiva para vermelho de metila (VM), produção de indol, motilidade, lisina e negativa para as provas de catalase, oxidase, utilização do citrato e Voger Proskauer (VP). Não é capaz de utilizar a ureia como única fonte de nitrogênio, descarboxila os aminoácidos arginina, lisina e ornitina (STROHL et. al.; 2004; QUINN et al. 2005).

Normalmente, produzem colônias de coloração rósea em ágar MacConkey e podem apresentar atividade hemolítica em ágar sangue (QUINN et al. 2005). Em meios sólidos em placas, apresentam tamanho que varia de 1.1 a 1.5 µm por 2-6 µm, com motilidade positiva ou negativa, devido a presença de flagelos peritríqueos (STROHL et. al.; 2004; FERREIRA; KNÖBL, 2009). Podem, ainda, apresentar-se na forma lisa, convexa e brilhante, com bordos regulares e colônias rugosas com aspecto e aparência grosseira, contornos irregulares e em outras colônias, algumas características mucóides. A temperatura ideal para a sua multiplicação é de 37°C, porém, conseguem multiplicar-se em temperaturas de 18 a 44°C (QUINN et al. 2005).

2.2.2 Estrutura antigênica e fatores de virulência

Uma das principais contribuições para a caracterização da *E. coli* foi o estabelecimento dos métodos sorológicos descritos por KAUFFMAN (1947), em que propôs que as estirpes fossem identificadas de acordo com seus principais antígenos de superfície: antígeno O (somático) lipopolissacarídeo (LPS) termoestável – 121°C por 2 horas presente na membrana externa das bactérias Gram negativas; antígeno K (capsular), relacionado com polissacarídeos capsulares que envolvem a parede celular; antígeno H (flagelar), que possui estrutura de natureza proteica, termolábil (100°C por 30 min); e antígeno F (fimbrial), também chamado de *pili*, adesinas ou ainda fímbrias, capaz de reconhecer receptores específicos na superfície de células eucarióticas (BARNES et al., 2004).

Algumas estirpes de *E. coli* apresentam, ainda, a capacidade de sintetizar colicinas, substâncias que inibem o crescimento de outras espécies bacterianas no nicho em que estão presentes. A capacidade da bactéria em sintetizar compostos ca-

pazes de obter o ferro (sideróforos e hemolisinas) permite a sua multiplicação em fluidos. A aerobactina é um sideróforo que promove crescimento bacteriano em meios de concentração limitada de ferro em linhagens de *E. coli* extraintestinais que causam pielonefrite e cistite. Estirpes patogênicas também produzem invasinas, citotoxinas e enterotoxinas, responsáveis pela invasão e lesão celular. Muitos genes de virulência contribuem, ainda, para a evasão do Sistema Imune (SI) do hospedeiro (SUSSMAN, 1997; VIEIRA, 2009).

Todos esses antígenos representam a base para a identificação sorológica, além de contribuir para o conhecimento da epidemiologia, grau de patogenicidade e severidade das infecções que dependem da virulência do agente (KNÖBL et al., 2008). Segundo Trabulsi; Alterthum (2008) são descritos 117 antígenos somáticos, 100 capsulares e 52 flagelares. Segundo Barnes et al. (2003) existem estirpes rugosas, que são autoaglutinantes e não podem ser sorotipadas, devido à perda parcial ou total da cadeia de polissacarídeo, não fornecendo uma identificação definitiva.

Uma combinação específica dos antígenos O e H define o “sorotipo” da estirpe isolada, enquanto apenas a determinação do antígeno O define o “sorogrupo”. Portanto, estirpes de *E. coli* podem ser classificadas tanto pelo seu sorogrupo (por exemplo: *E. coli* O:157 em que O refere-se ao O-antígeno de LPS), quanto pelo seu sorotipo (por exemplo: *E. coli* O157:H7, em que H se refere ao antígeno flagelar). Desta maneira, cada patotipo contém muitos sorotipos e alguns sorotipos podem, ainda, pertencer a mais de um patotipo (NATARO; KAPER, 1998; CLEMENT et al., 2012).

2.2.3 Patogênese

Escherichia coli patogênica é classificada de acordo com as suas propriedades de virulência, sintomas de doenças, espécies e aspectos epidemiológicos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A patogenicidade se manifesta por mecanismos multifatoriais envolvendo fatores de virulência presentes em determinados sorotipos. Durante o processo evolutivo de *E. coli*, o potencial patogênico de algumas estirpes se deve a ganhos genéticos, devido à aquisição de genes de virulência por estirpes

comensais de *E. coli*, por meio de mutações ou transferência horizontal de material genético (KUHNERT et al., 2000).

Assim como ocorre na maioria dos patógenos de mucosas, *E. coli* segue uma sequência de eventos para que cause infecção. Primeiramente a colonização da mucosa intestinal, seguindo de evasão das defesas do hospedeiro, multiplicação e, por último, dano ao hospedeiro. A colonização das células intestinais ocorre por meio de adesinas, que podem ser fimbriais ou não. Algumas estirpes de *E. coli* interagem com o citoesqueleto das células intestinais, modificando a estrutura das microvilosidades dos enteócitos, enquanto outras produzem diversas toxinas. Esses fatores de virulência são codificados por genes presentes em ilhas de patogenicidade ou em plasmídeos, podendo também ser transferidos entre estirpes de *E. coli* por bacteriófagos (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; COURA et. al., 2014).

Em 1990, Hacker; Carniel (2001) introduziram os primeiros conceitos sobre ilha de patogenicidade, quando observaram uma ligação entre os genes que codificavam fatores de colonização e hemolisina de UPEC. Esses genes estavam presentes em grandes regiões cromossômicas, que apresentavam características próprias e grande instabilidade. A partir daí, segundo Viera (2009), a presença de PAIs foi descrita em vários micro-organismos causadores de doenças, tanto em humanos, como em patógenos de animais e plantas. As PAIs são segmentos de DNA, com 10.000 a 200.000 pares de bases, que codificam fatores de virulência (VIEIRA, 2009). No cromossomo, estes determinantes estão organizados em grandes fragmentos de DNA, denominados ilhas de patogenicidade (PAIs – Pathogenicity Islands) ou em plasmídeos contendo material genético extra-cromossômico. Ambos codificam proteínas que possibilitam a colonização, penetração e invasão no hospedeira (VIEIRA, 2009). A presença destes fatores de virulência permite que a bactéria resista aos mecanismos de defesa do hospedeiro, tanto específicos como inespecíficos), desencadeando o processo de doença (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

Técnicas de biologia molecular permitiram a classificação em diferentes patotipos pela detecção de fatores de virulência codificados por plasmídeos, bacteriófagos, ou ilhas de patogenicidade (GYLES; FAIRBROTHER, 2010) e de genes de resistência a antimicrobianos (FERREIRA; KNÖBL, 2009; VIEIRA, 2009). De acordo com o patotipo, o sorogrupo e a presença de genes de virulência, as linhagens de *E. coli* podem causar desde quadro leves de diarreia, até a doença septicêmica grave.

O estudo da diversidade de *E. coli* era caracterizado, principalmente, pela sorotipagem, antes mesmo da era molecular. Como o conhecimento genético progrediu, houve o surgimento do MLST (*Multi-locus sequence typing*) e a acumulação de dados de sequências nucleotídicas, que acabou definindo os sete grandes grupos filogenéticos, designados A, B1, B2, C, D, E e F proposto por Clermont et al. (2013). A identificação dos filogrupos é necessária para a compreensão das infecções causadas pela *E. coli*. Existem três MLST databases para *E. coli* baseadas em três combinações de genes diferentes com apenas um gene em comum, *icd*. A razão para a escolha dos genes utilizados nas diferentes técnicas de MLST não é clara, mas os genes usados são todos constitutivos (*housekeeping*) (CLERMONT; GORDON; DENAMUR, 2015),

2.2.4 *Escherichia coli* diarreiogênica

As categorias que causam infecção intestinal são conhecidas como *E. coli* diarreiogênica (DEC- *Diarreiogenic Escherichia coli*). As estirpes patogênicas de *E. coli* são divididas em: EPEC (*E.coli* enteropatogênica), APEC (*E. coli* patogênica aviária), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), STEC (*E.coli* produtora de toxina tipo Shiga), EaggEC (*E. coli* enteroagregativa), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998; CLEMENTS et al., 2012). Geralmente estes patótipos causam dores abdominais, diarreia, diarreia hemorrágica e, em alguns casos, febre, além de vômitos (CDC, 2014).

Os patótipos que causam infecção extraintestinais, são conhecidas como: ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*): UPEC (*E. coli* uropatogênica), NMEC (*E. coli* causadora de meningite neonatal (CROXEN; FINLAY, 2010; CLEMENTS et al., 2012; CDC, 2014).

2.2.4.1 *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

E. coli enteropatogênica (EPEC) é a maior causa de diarreia em crianças com idade inferior a um ano nos países em desenvolvimento. Geralmente, são mais severas do que as ocasionadas por outros patógenos, com prevalência de óbito em torno de 30% (WALKER et al., 2013), e acomete diversas espécies animais, como coelhos, porcos, cães e gatos (NAKAZATO et al., 2004; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Normalmente, coloniza o intestino delgado, causando diarreia e alterações na superfície das células epiteliais intestinais (NATARRO; KAPER, 1998). Os humanos são considerados reservatórios de EPEC típica (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). A EPEC atípica pode ser isolada tanto em humanos, quanto em animais, sendo as aves consideradas importantes reservatórios do agente (KNÖBL et al., 2011; SAIDENBERG et al., 2012a).

Atualmente, a EPEC é dividida em EPEC típica e atípica, ambas desprovidas de genes que codificam a toxina Shiga (Stx) (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; CLEMENTS et al., 2012). Outra diferença é a combinação de antígenos O e H (sorotipos) e a presença de Plasmídeos EAF (*EPEC Adherence Factor*), que contém genes envolvidos na biogênese de uma adesina fimbrial denominada *bundle-forming pilus* (BFP), expressa na superfície bacteriana, importante fator de virulência, ocorrendo somente na EPEC típica e ausente na EPEC atípica (TRABULSI; ALTERTUM, 2008; NARA et al., 2010). A adesina BFP contribui para a ligação da bactéria às células eucarióticas, resultando na aderência localizada em cultura de células intestinais (GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Entre os vários sorotipos de EPEC, os que predominam no Brasil são, respectivamente:

- EPEC típica: O55:H6, O86:H34, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6, O142:H34
- EPEC atípica: O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111ac:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2 (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; FOCACCIA, 2005).

Com a melhoria das condições de saneamento básico no Brasil, houve uma redução na ocorrência de EPEC típica, em relação às amostras atípicas (RÉGUA-

MANGIA et al., 2004; FRANZOLINI et al., 2005). Isso despertou o crescente interesse da comunidade científica pelo grupo de EPEC atípicas (AFSET et al., 2004; GOMES et al., 2004).

Os fatores de virulência envolvidos na patogenia da lesão que EPEC produz na célula hospedeira, distinguem-se em três estágios: contato inicial, adesão frouxa e adesão firme (SILVA; SILVA, 2005).

O primeiro estágio, denominado adesão localizada (*localized adhesion* – LA), é caracterizado pelo contato inicial entre a bactéria e a célula hospedeira, mediado por fimbrias do tipo IV, expressas na superfície bacteriana denominadas BFP e filamentos translocadores, chamados de EspA (*EPEC secreted proteins A*). EPEC coloniza principalmente as microvilosidades do intestino delgado, desencadeado pela expressão de genes localizados na região LEE (CROXEN; FINLAY, 2010; MAINIL 2013).

O segundo estágio, também conhecido como adesão frouxa, possui a particularidade de causar um tipo de lesão histológica patognomônica, denominada *attaching and effacing* (A/E), em células epiteliais intestinais. Segundo Silva; Silva (2005), BFP sofre modificações estruturais, formando *pilus bundles* de 40nm de diâmetro. Estes, por sua vez, espessam-se e alongam-se, podendo chegar a 100nm, formando uma rede frouxa tridimensional (CROXEN; FINLAY, 2010).

A lesão A/E é caracterizada pela adesão íntima da bactéria ao epitélio intestinal, com destruição das microvilosidades intestinais, alterações no citoesqueleto, formação de estruturas semelhantes a pedestais e acúmulo de moléculas de α -actina polimerizada logo abaixo da ligação da bactéria à célula (HU; TORRRES, 2015; FRANZIN; SIRCILI, 2015). Esses aspectos podem ser visualizados em microscopia eletrônica (VIEIRA, 2009). A habilidade de produzir A/E não se restringe a EPEC; mas também em *E. coli*, produtora de Shiga toxina, e em outras espécies de bactérias (SILVA; SILVA, 2005).

O terceiro estágio (adesão firme) ocorre quando há adesão da bactéria às células epiteliais intestinais, mediada pela fimbria BFP e filamentos translocadores chamados de EspA, ocorrendo a destruição das microvilosidades. Logo após, moléculas efetoras são translocadas para dentro da célula hospedeira por meio do sistema de secreção Tipo III (*Type Three Secretion System* - TTSS) – (SST3). Em seguida a bactéria perde os filamentos de EspA, levando a uma adesão íntima da bactéria ao enterócito, mediada pela interação íntima (codificada pelo gene *eae*) e seu re-

ceptor Tir. Essa interação provoca o acúmulo de actina polimerizada e de outros componentes no local da adesão (GOOSNEY et al., 2000).

A interação intimina-Tir permite a fixação de EPEC na superfície da célula hospedeira, o início dos processos de sinalização celular e a reorganização de componentes do citoesqueleto para formar o pedestal (GOOSNEY et al., 2000), causando desbalanço hidroeletrolítico e diarreia (CROXEN; FINLAY, 2010). Tir funciona como um receptor para intimina, enquanto EspB e EspD formam poros para transferência de outras moléculas efetoras para o interior da célula hospedeira (SILVA; SILVA, 2005). Desta interação, os processos de sinalização são emitidos para a célula hospedeira. São eles: ativação de fosfolipase C, efluxo de inositol trifosfato e liberação de Ca^{++} para o citosol. A porção de Tir exposta no citosol sofre uma fosforilação no resíduo de tirosina, permitindo sua ligação à proteína adaptadora Nck, que, por sua vez, recruta proteínas regulatórias de actina N-WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome*) e Arp2/3 (*actin-related protein*), levando à formação de um complexo proteico capaz de realizar a polimerização dos filamentos de actina. O citoesqueleto se reorganiza, formando o pedestal sobre o qual a bactéria se apoia (MAINIL, 2013).

As aves silvestres são consideradas importantes reservatórios naturais de *E. coli*. Estudos têm indicado que a bactéria pode ser facilmente isolada de várias espécies como de passeriformes, aves aquáticas de vida livre e anatídeos (FALLACARA et al., 2001). Ainda segundo Sacristán et al. (2014), as espécies de aves selvagens desempenham um papel importante na contaminação fecal de água potável e de culturas agrícolas. Eles também podem entrar em contato próximo com aves domésticas, facilitando, assim, a transferência direta de agentes infecciosos e genes de resistência a antibióticos, especialmente para as aves de quintal e domiciliadas. De acordo com os resultados pesquisados pelos autores, pombos selvagens, estorninhos e pardais poderiam ser considerados portadores de cepas aEPEC, indicando a importância das aves sinantrópicas como reservatórios de genes de virulência e potenciais agentes zoonóticos.

Knöbl et al. (2008) analisaram diversos fatores de virulência em papagaios com colibacilose, demonstrando que *E. coli* isoladas de animais doentes apresentam alguns fatores de virulência do patotipo de *E. coli* patogênica para aves, EPEC atípica (APEC). Porém, no trabalho realizado por Reple et al. (2015) foram isoladas EPEC típicas, que são consideradas raras em animais, sendo este patotipo encontrado

principalmente em humanos. A presença de EPEC típicas em psitacídeos sugere a transmissão de caráter antroponóico como mais provável (REPLE et al., 2015).

2.2.4.2 *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e subtipo entero-hemorrágica (EHEC)

Entre os patótipos de *E. coli* diarreio gênicas, a STEC merece ênfase por pertencer ao grupo de bactérias patogênicas emergentes envolvidas em surtos de doenças transmitidas por alimentos de origem animal contaminados, representando um grande desafio à saúde pública (CARVALHO et al., 2012). Estão ligadas a um amplo espectro de doenças humanas, que causam desde uma diarreia leve, até severas diarreias sanguinolentas (colites hemorrágicas – CH), podendo evoluir para complicações extraintestinais graves, como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), falência renal e a púrpura trombocitopênica, que acomete principalmente idosos (CALDORIN et al., 2013).

Este patótipo possui duas designações, STEC e EHEC. A primeira refere-se a estirpes de *E. coli* produtoras da toxina de Shiga 1 e/ou 2 (Stx1 e/ou Stx2), denominadas pela semelhança à toxina produzida pela *Shigella dysenteriae*. A segunda corresponde ao subgrupo de sorótipos de STEC que, além de produzir essa toxina, é capaz de causar a lesão histológica *attaching and effacing* (A/E) (RODRIGUES et al., 2008; MELTON-CELSA, 2014). Ensaio imunológico de neutralização demonstraram que Stx1 é neutralizado pelo antissoro da citotoxina de *S. dysenteriae* 1, pois são consideradas idênticas e o grupo 2, Stx2, é neutralizável apenas por anti-Stx2 (BERTÃO; SARIDAKIS, 2007). Após os subtipos de cada toxina terem sido identificados, a toxina protótipo de cada grupo, foi designada como Stx1a com duas variantes: Stx1c (descritas em humanos e ovinos) e Stx1d (descritas em bovinos), apresentando poucas diferenças nas suas sequências genéticas, sem maiores consequências nas suas propriedades antigênicas e citotóxicas associadas. A doença resultante é de curso leve (BERTÃO; SARIDAKIS, 2007).

Stx2a, por sua vez, apresenta cinco variantes biológicas, diferindo umas das outras por sua antigenicidade, toxicidade e sequência genética: Stx2c – exibe uma reduzida citotoxicidade em células Vero; Stx2d – aumenta a citotoxicidade das célu-

las Vero e é associado às manifestações graves como SUH; Stx2f (anteriormente denominada Stx2ev), isoladas de humanos e aves; Stx2e, isolada de suínos e Stx2g, associada com STEC animal (MELTON-CELSA, 2014).

O gene *stx*, que codifica a toxina, está localizado no genoma de bacteriófagos integrando-se ao cromossomo da célula hospedeira (CALDORIN et al., 2013). A presença desses genes em bacteriófagos propicia não somente a capacidade de disseminação entre diferentes cepas, mas também possibilita a presença das duas toxinas em uma mesma bactéria. Porém, segundo Bertão e Saridakis (2007), os genes para Stx2 já foram encontrados em cromossomo.

Nos países em desenvolvimento, a frequência de STEC é baixa. Ainda assim, a preocupação com essas doenças ocasionadas por estirpes de EHEC tem aumentado, pois surtos de diarreia hemorrágica estão sendo relatados com maior frequência (CROXEN; FINLAY, 2010).

A maioria dos surtos de infecções por EHEC é causada por amostras do sorotipo O:157:H7; no entanto, mais de 100 sorotipos de *E. coli* produtoras de Stx já foram associados à colite hemorrágica e/ou síndrome hemolítica urêmica (SHU) (NATARO; KAPER, 1998). Os sorotipos não O:157:H7 mais frequentemente associados a humanos são O:103:H2, O:111:NM, O:111:H8, O:113:H21 e O:26:H11 (FOCACIA, 2005).

Segundo Bertão e Saridakis (2007) a principal característica de virulência (produção de toxinas Shiga), não é suficiente para causar doenças e outros fatores são considerados relevantes, como a presença do plasmídeo pO157, que codifica a enterro-hemolisina (*ehx*) e a produção de adesinas fimbriais e afimbriais. Acredita-se que a contribuição da enterro-hemolisina na patogênese das doenças causadas por STEC seja semelhante à de outras hemolisinas: o acesso ao elemento químico ferro, originário da lise dos eritrócitos, necessário ao metabolismo bacteriano e ao estímulo do crescimento de STEC (TRABULSI, 2008).

A suscetibilidade celular à toxina Shiga é determinada pela presença de receptores Gb3 ou Gb4 (Stx2e) para a toxina na superfície da célula. Nos seres humanos esses receptores estão presentes principalmente nas células epiteliais do intestino, nas células do endotélio vascular e nas células do epitélio renal. Sugere-se que os bovinos são insensíveis à ação da toxina Shiga ou que estas toxinas têm atividade diferenciada entre estes dois hospedeiros (MELTON-CELSA, 2014). Pruim-

boom-Brees et al. (2002) sugerem que a falta de receptores vasculares para a toxina Shiga explicaria o fato dos bovinos serem portadores sadios de STEC.

O caráter zoonótico está bem estabelecido. Os bovinos são descritos como uma das principais fontes de infecção de estirpes de EHEC, sendo considerados reservatórios para a infecção de humanos e favorecendo surtos associados ao consumo de carnes mal cozidas, leite não pasteurizado, além de verduras, frutas e água contaminadas com fezes de animais contendo EHEC, que servem como via de transmissão (NATARO; KAPER, 1998). Vários surtos ocorridos nos Estados Unidos, Canadá e Japão foram associados ao consumo de hambúrgueres (CALDORIN et al., 2012).

STEC geralmente colonizam o terço final do intestino e são excretadas pelas fezes, sem causar prejuízos ao animal. Porém, já foram encontrados em outros animais como: suínos, gatos, cães, galinhas, caprinos, gaivotas, animais selvagens e outras aves (JORIS et al., 2013).

2.2.4.3 *E. coli* enterotoxigênica (ETECs)

E. coli enterotoxigênica (ETECs) é associada à diarreia infantil com óbito de mais de 300.000 crianças com menos de cinco anos, em regiões endêmicas de países em desenvolvimento. É considerada, ainda, a principal causa da diarreia dos viajantes, afetando turistas e militares que circulam em regiões endêmicas (ROCHA et al., 2013).

Constituída por estirpes que infectam homens e animais, este patotipo é caracterizado pela produção das enterotoxinas termo-lábil (LT) e/ou enterotoxina termoestável (ST), ambas codificadas em plasmídeos (ROCHA et al., 2013). Estão associadas a vários sorotipos, sendo os mais frequentes: O:6:H:16 e O:78:H:12 (LAI et al., 2013). A toxina LT apresenta estrutura e função semelhantes à toxina colérica e pode ser classificada em LT-I, expressa em cepas patogênicas, tanto para humanos, como para animais, e LT-II, encontrada principalmente em isolados animais e raramente em humanos (FOCACCIA, 2005).

As toxinas termoestáveis (ST) são pequenas, monoméricas, e contêm vários resíduos de cisteína, formando pontes de dissulfeto, que lhes conferem a termoes-

tabilidade. São classificadas em STa (ou ST-I), presente em amostras isoladas de humanos e de suínos, e STb (ou ST-II), associada principalmente com estirpes isoladas de suínos (FOCACCIA, 2005).

A transmissão por ETEC é pela via oral e a fixação no epitélio do intestino delgado ocorre pela ação de adesinas fimbriais. A adesão da bactéria aos enterócitos por meio de fatores de colonização (FC), adesinas tia e tib (CLEMENTS et al., 2012,) e a produção das toxinas LT e/ou ST determinam uma diarreia secretória, em que ocorre a estimulação de secreção de água e eletrólitos no lúmen intestinal, ocasionando um quadro de diarreia líquida, desidratação grave em crianças nos primeiros anos de vida, podendo evoluir para a morte (HIRSH, 2003). É, também, uma das principais causas de diarreia em viajantes – neste caso, o quadro clínico se manifesta por diarreia líquida, dor abdominal, febre baixa, náusea e mal-estar. A infecção é autolimitada, durando não mais que cinco dias, exigindo, especialmente em crianças, idosos debilitados e imunocomprometidos, a reposição hidroeletrólítica (RODRIGUES et al., 2008; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

2.2.4.4 *E. coli* enteroagregativa (EaggEC)

EaggEC foi um dos últimos patótipos descrito (1985) e está associada à diarreia persistente com duração de mais de 14 dias em crianças e adultos, tanto em países desenvolvidos, como nos em desenvolvimento (KAPER et al., 2004). Outros estudos, porém, relataram um número considerável de portadores assintomáticos, não se encontrando tal associação. Em vários países, a EaggEC tem sido associada à diarreia persistente, com duração igual ou superior a 14 dias (FOCACCIA, 2005). EaggEC produz uma toxina termoestável enteroagregativa (EAST1), codificadas por plasmídeo, bem como as fímbrias de aderência agregativa (AAF). O gene *aggR* é o ativador transcripcional que regula a transcrição de fatores de virulência plasmidiais e cromossômicos, importantes para a patogênese da EaggEC (MORIN et al., 2010).

A característica que define o patótipo *E. coli* EaggEC é seu padrão de adesão a células epiteliais, que consiste em um agregado celular lembrando tijolos empilhados (LAI et al., 2013).

A patogênese de EAEC envolve três estágios: aderência na mucosa intestinal por meio das fímbrias de aderência agregativa (AAF) e/ou outras adesinas. Em um outro estágio, ocorre a multiplicação da bactéria formando um biofilme. Finalmente, ocorre a produção de toxinas, o processo inflamatório e o aumento da produção de muco, desencadeando a diarreia (NATARO; KAPER, 1998).

2.2.4.5 *E. coli* enteroinvasora (EIEC)

As infecções intestinais provocadas por *E. coli* enteroinvasora (EIEC) são raras, sendo mais frequentes em crianças maiores de dois anos de idade e em adultos (FOCACCIA, 2005). É o único patótipo dentre as DEC's que envolve patógenos intracelulares e a maioria das estirpes apresentam características bioquímicas e genéticas que as tornam semelhantes à *Shigella* spp., podendo ser indistinguíveis (SASAKAWA, 2010).

EIEC infectam as células do cólon, invadindo o epitélio, multiplicando-se e movendo-se por meio de filamentos de actina do citosol até os polos da célula, colonizando células epiteliais adjacentes. Causa morte celular por apoptose, levando à inflamação, destruição da mucosa do cólon. Os sintomas característicos da infecção são diarreia aquosa, cólica abdominal, febre e mal-estar geral, além da presença de sangue, muco nas fezes (RODRIGUES et al., 2008).

Entre essas características especiais, estão a incapacidade de descarboxilar a lisina, ausência ou fermentação tardia da lactose e a imobilidade (RODRIGUES et al., 2008; ANVISA, 2014), além de abrigar plasmídeo de 220 kb que codifica o operon *ipa* e medeia a invasão das células epiteliais do intestino. As EIEC compreendem um número restrito de sorotipos: O:28ac:H-, O:124:H-, O:124:H34, O:136:H-, O:152:H- e O:167:H- (LAI et al., 2013).

2.2.4.6 *E. coli* aderente difusamente (DAEC)

A DAEC é um patotipo caracterizado por seu padrão de adesão, que envolve toda a célula (adesão difusa – AD), demonstradas em células Hep-2 e HeLa e ausência de fatores de virulência típicos como presentes em outros patotipos da DEC (NATARO; KAPER, 1998). Alguns estudos sugerem que pode ou não causar diarreia em crianças maiores e menores de 12 anos, respectivamente (FOCACCIA, 2005). Seu real papel na síndrome diarreica, porém, ainda não está definido (RODRIGUES et al., 2008). A maioria das estirpes de DAEC apresenta uma adesina chamada F1845, que seria responsável pela aderência difusa da bactéria ao epitélio intestinal. O gene que codifica esta fímbria pode estar no cromossomo ou em plasmídeos (NATARO; KAPER, 1998). Uma proteína pertencente à família de adesinas Dr, cujo receptor chamado DAF (*decay- accelerating factor*) é encontrada, em grande porcentagem, em estirpes de DAEC (KAPER et al., 2004).

3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *E. coli* DIARREIOGÊNICAS ISOLADAS DE PSITACÍDEOS DE PEQUENO PORTE CRIADOS COMO *PETS*.

3.1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal de mamíferos e de algumas espécies de aves. Porém, a presença do agente no trato gastrointestinal de psitacídeos é considerada um risco sanitário (SAIDENBERG et al., 2012).

As calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e agapornis (*Agapornis* sp) são as espécies de psitacídeos de pequeno porte mais frequentemente escolhidas como *pets* no Brasil (SICK, 1997; GRESPAN, 2010). A criação dessas aves aumentou e a proximidade com seres humanos e outros animais de estimação pode facilitar a contaminação ambiental e a infecção por contato indireto (MATTES et al., 2005 ; GRESPAN, 2010). A microbiota desses animais é composta predominantemente por bactérias Gram-positivas, e a presença de bactérias Gram-negativas, incluindo *E. coli* é uma ameaça à saúde animal e a saúde pública (XENOULIS et al., 2010).

A distinção de estirpes comensais e patogênicas de *E. coli* é mandatória. Para isso, são necessários estudos que caracterizam fatores de virulência de diferentes patótipos diarreiogênicos.

Este trabalho avaliou a presença de *E. coli* diarreiogênica em psitacídeos de pequeno porte criados como *pet*. As estirpes isoladas foram identificadas por meio da PCR para os genes de virulência e determinação do sorogrupo, caracterizadas fenotipicamente com base no perfil de resistência antimicrobiana e formação de biofilme e, genotipicamente, pelo filogrupo e perfil de AFLP.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Medicina Aviária do Departamento de Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP) e no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan – SP.

3.2.2 Animais e coleta de amostras

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo e autorizado para fins científicos (CEUA7423290414 / 2014). O estudo foi realizado com amostras fecais de 171 psitacídeos, sendo 67 calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), 59 periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e 45 agapornis (*Agapornis* spp.) domiciliados na cidade de São Paulo. Todas as aves foram consideradas clinicamente saudáveis ao exame físico no momento da coleta. A idade e sexo dos pássaros eram variados. Após a cobertura do fundo da gaiola com papel autoclavado, as fezes recém-excretadas foram coletadas com auxílio de suabes estéreis (meio de Stuart, DIFCO®), numeradas, identificadas (Quadro 1), transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Medicina Aviária e mantidas a 4°C até o processamento.

Quadro 1 – Identificação das aves analisadas por espécies

Espécie	Nº total de amostras por espécie
Calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	67 (39,18%)
Periquito australiano (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	59 (34,50%)
Agapornis (<i>Agapornis</i> spp)	45 (26,32%)
Total de amostras	171 (100%)

3.2.3 Amostras bacterianas

Métodos bacteriológicos padrão foram utilizados para o isolamento e identificação de Enterobacteriaceas. As amostras de excretas foram incubadas em Água Peptonada Tamponada (DIFCO™) 0,1% (ANEXO A) a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica. De cada amostra dos tubos de água peptonada, foram transferidos e inoculados 100 microlitros (µL) para caldo BHI (Infusão Cérebro e Coração) – (Difco-BBL, Detroit, MI, EUA) (ANEXO B) e incubados a 35°C (+ ou – 2°C) por 24 horas. Após o enriquecimento, uma alçada do caldo BHI foi coletada e as amostras plaqueadas em ágar de MacConkey (DIFCO™) incubadas novamente a 37°C por 24 - 48 horas, para o isolamento das bactérias, seguindo especificações do fabricante (ANEXO C).

As colônias foram identificadas pela morfologia e por meio de série bioquímica, de acordo com as informações contidas no Manual Bergey de Identificação Bacteriológica (HOLT et al., 1994). De cada meio seletivo, foram transferidas três unidades formadoras de colônias para tubos contendo ágar triplice açúcar-ferro (TSI) – (KASVI™) (ANEXO D) e incubados a 37°C por 24 horas.

Testes bioquímicos convencionais (EPM, Mili e Citrato de Simmons-Probac®) foram utilizados para identificar os gêneros bacterianos. O meio EPM (Escola Paulista de Medicina) contém testes bioquímicos, onde são evidenciadas: fermentação de glicose (amarelo), produção de ácido sulfídrico - H_2S (preto), produção de urease (azulado), L triptofano desaminase - LTD (verde oliva) e produção de gás (presença de bolhas de ar ou deslocamento do meio). O meio MILi, evidencia o teste de motilidade (crescimento além da linha de picada), a produção de indol (presença de anel de coloração vermelha após pingar o reativo Kovacs) e a descarboxilação de lisina (mantém cor púrpura) e o meio Citrato de Simmons que permite avaliar a habilidade da bactéria em utilizar citrato de sódio como única fonte de carbono (azul).

As colônias identificadas como *Escherichia coli* foram estocadas em meio LB (Lúria Bertani) (ANEXO E) a temperatura ambiente; congeladas em glicerol 15% e mantidos em freezer -80°C para posterior extração do DNA bacteriano e realização da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção dos genes de virulência.

3.2.4 Determinação dos fatores de virulência através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR)

Dez pares de *primers* (sequência de oligonucleotídeos) foram utilizados para a pesquisa de fatores de virulência dos patótipos diarreio gênicos de relevância epidemiológica na medicina veterinária: EPEC, STEC, ETEC e EAEC. Após as estirpes serem cultivadas em caldo LB a 37°C por 18 horas e semeadas em placa de Petri com meio Ágar triptona soja (TSA) (ANEXO F) a 37°C por mais 18 horas, duas alças de inóculo foram transferidas para microtubos contendo 1mL de água ultrapura estéril, agitadas em Vortex® por 15 segundos e centrifugadas a 12.000 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos para cada amostra. Esse procedimento foi realizado por duas vezes consecutivas e a seguir diluído cada *pellet* em 200 µL de água ultrapura estéril e submetidos à fervura por 10 minutos, sendo imediatamente colocadas em freezer por cinco minutos, centrifugados a 5.000 rpm por cinco minutos, coletados os sobrenadantes, identificados e estocados a -20°C.

Após a extração, foram realizadas as pesquisas para os genes *eae*, *bfpA*, *stx1* e *stx2*, LT e ST, *aggR*, *aaiA*, *aatA* e *aaiG* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), segundo metodologias descritas por Mora et al. (2012); Elias et al. (2002); Tsen e Jian (1998); Yavzori et al. (1998) e Andrade et al. (2014) respectivamente.

A amplificação foi realizada em termociclador (*Mastercycler Gradient, Eppendorf*). A mistura para a amplificação foi constituída por PCR buffer 1X, 1.5mM de MgCl₂, 0.2mM de trifosfatos de desoxinucleotídeos, 10 picomols de cada *primer*, Taq DNA polimerase 0.5 U, água autoclavada ultrapura e 3 µL do DNA molde, em um volume final de 25 µL, tal como descrito por Yu e Kaper (1992) e Pal et al. (1999). Os genes de virulência, os iniciadores utilizados na amplificação, o tamanho do fragmento amplificado e as referências de cada reação são descritas na Tabela 1. Os produtos da amplificação foram separados na eletroforese, em gel de agarose 1,5% e corados com Gel Red (Biotium, Hayward, CA, EUA). O marcador de peso molecular utilizado foi o 100-bp DNA ladder (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

Foram utilizadas amostras de DNA genômico de referência para *E.coli*, os controles positivos: E2348/69; e controle negativo DH5α.

Tabela 1 – Fatores de virulência pesquisados pela reação em cadeia pela polimerase para identificação de *E. coli* diarreio gênicas de relevância epidemiológica: EPEC, STEC, ETEC e EAEC.

Genes	Sequência dos iniciadores (5'-3')	PCR ciclo	Fragmento	Referência
Intimina (<i>eae</i>)	<i>eae</i> V3F- CATTGATCAGGATTTTCTGGT <i>eae</i> MBR- TCCAGAATAATATTGTTATTACG	30x:1'94°C; 40" 55°C; 2'72°C; 3'72°C	510 pb	Mora et al., 2012
Fimbria BFP (<i>bfpA</i>)	F- GGTCTGTCTTTGATTGAATC R- TTTACATGCAGTTGCCGCTT	30x:1'94°C;1'55° C; 1'72°C	485 pb	Elias et al., 2002
Toxina Shiga 1 (<i>stx1</i>)	F- AGCTGAAGCTTTACGTTTTCCGGG R- TTTGCGCACTGAGAAGAAGAGA	30x:1'94°C;1'62° C; 1'72°C	590 pb	Tsen & Jian, 1998
Toxina Shiga 2 (<i>stx2</i>)	F- TTTCCATGACAACGGACAGCAGTT R- ATCCTCATTATACTTGGA AAACTCA	30x:1'94°C;1'62° C; 1'72°C	694 pb	Tsen & Jian, 1998
LT	F- GGCGACAGATTATACCGTGC R- CCGAATTCTGTTATATATGTC	30x:1'95°C;1.10' 45°C;1.30'72°C; 5'72°C	696 pb	Yavzori et al., 1998
ST	F- TCTGTATTGTCTTTTTCACC R- TTAATAGCACCCGGTACAAGC	30x:1'95°C;1.10' 45°C;1.30'72°C; 5'72°C	186 pb	Yavzori et al., 1998
<i>aggR</i>	Multiplex PCR F- CGATACATTAAGACGCCTAAAG R- TCTGATACATTAAATTCATCTGC		346 pb	Andrade et al., 2014
<i>aaiA</i>	F- CCCACGACCAGATAACG R- GTTTTTCAGGATTGCCATTAG	94°C/5 min; 30x (94°C/1min,	476 pb	
<i>aatA</i>	F- CTGGCGAAAGACTGTATCAT R- CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	56°C/1 min, 72°C/1min);	630 pb	
<i>aaiG</i>	F- GGGAGTGTTTCAGTCTGGAC R-ATTTGTCACAAGCTCAGCAT	72°C/7min	782 pb	

3.2.5 Determinação do Sorogrupo

A determinação dos antígenos O e H foi realizada pelo método descrito por Guinée et al. (1981), por meio de reação de soroaglutinação rápida com antissoros produzidos em Laboratório de Referência. Uma amostra STEC positiva foi encaminhada para sorotipagem ao Laboratório de referência – STATENS SERUM INSTITUT (Department of Microbiology & Infection Control - Copenhagen) e todas as dez foram encaminhadas ao Laboratório de referência, Instituto Adolfo Lutz.

3.2.6 Perfil de resistência

O perfil de resistência bacteriana foi determinado utilizando a técnica de difusão em ágar com discos impregnados com antibióticos, seguindo o protocolo da “Clinical and Laboratory Standard Institute” (CLSI, 2008; CLSI, 2013). Todas as estirpes de *Escherichia coli* isoladas foram semeadas em tubos contendo 2 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, com o auxílio de uma pipeta “Pasteur” esterilizada, transferiu-se o inóculo para tubos contendo 2 mL de solução salina 0,85% esterilizada, em quantidade suficiente para que se obtivesse uma turbidez compatível com o grau 0,5 da escala de MacFarland. Com o auxílio de um suabe estéril, o inóculo foi estriado uniformemente sobre a superfície seca de uma placa contendo ágar Mueller-Hinton (ANEXO G).

Com o auxílio de uma pinça flambada, foram colocados sobre a superfície do meio os discos dos seguintes antimicrobianos: Ampicilina - AMP (10µg), cloranfenicol – CLO (30µg), amicacina - AMI (30µg), ceftriaxona – CRO (30µg), gentamicina – GEN (10µg), nitrofurantoína – NIT (300µg), cefepime – CPM (30µg), ceftiofur – CTF (10µg), cefoxitina – CFO (30µg), cefotaxima – CTX (30µg), polimixina B – POL (300UI), tetraciclina - TET (30µg), florfenicol – FLOR (30µg), sulfametazina – SUL (300µg), sulfametoxazol-trimetoprim – SXT (25µg), fosfomicina – FOS (200 µg), enrofloxacin – ENO (5µg), ciprofloxacino – CIP (5µg), ácido nalidíxico – NAL (30 µg), estreptomicina – STR (10µg), neomicina – NEO (30µg), e tobramicina - TOB (10µg). Após esse procedimento, as placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C durante 24 horas.

A leitura foi realizada com o auxílio de uma régua milimétrica, medindo-se o diâmetro dos halos inibitórios de cada disco e comparando-os com uma tabela padrão interpretativa da zona de inibição em milímetros, determinando, então, as estirpes em análise como sensíveis, resistentes ou intermediárias ao antimicrobiano testado. A cepa foi considerada resistente a múltiplas drogas (MDR) ao demonstrar resistência a três ou mais classes de antibióticos (SCHWARZ et al., 2010) e a cepa utilizada como controle foi *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.2.7 Ensaio de Formação de Biofilme

A análise quantitativa da formação de biofilme em placas de poliestireno foi realizada seguindo a metodologia descrita por Sheikh et al. (2001), com modificações. As amostras bacterianas foram cultivadas em caldo Luria-Bertani numa diluição de 1:100 (2 μ L em 200 μ L) em microplaca de poliestireno de 96 poços (TPP, Suíça), em triplicatas. Uma coluna da placa foi preenchida apenas com meio de cultura. A placa foi incubada a 37°C sem agitação durante 24 horas e a biomassa de biofilme (células vivas, mortas e matriz) dos isolados foi quantificada após coloração com cristal violeta, seguindo a metodologia descrita abaixo.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi aspirado e os poços foram lavados por três vezes com tampão fosfato (PBS), pH 7,4 para remoção das bactérias planctônicas. O biofilme foi pré-fixado com 200 μ L de etanol a 75% por 10 minutos a temperatura ambiente. O fixador foi retirado e as bactérias foram coradas com 200 μ L de solução de cristal violeta a 0,5% por 5 minutos. O corante foi removido e após quatro lavagens com PBS, as placas foram secas. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L de etanol 95% em cada poço, para solubilização do corante durante 2 minutos à temperatura ambiente.

Foram transferidos 150 μ L de cada poço para outros poços vazios da mesma placa, para leitura da absorbância a 595nm no leitor de ELISA Multiskan®EX (Thermo Isher Scientific, EUA). Os dados para a formação de biofilme de todas as estirpes foram comparados com os dados da amostra controle de baixa formação de biofilme, a *E. coli* DH5 α (SAMBROCK et al., 1989). Também foi empregada a amostra EAEC 042 (NATARO et al., 1985), alta formadora de biofilme, como controle positivo.

Para a interpretação do teste, os isolados bacterianos foram classificados de acordo com Stepanović et al. (2000) em quatro categorias distintas em relação à amostra DH5 α , em que o ponto de corte (DOc) foi definido como três desvios padrões acima da DO média do controle negativo (DH5 α). Os isolados foram classificados em: não-aderente ($DO \leq DOc$), fracamente aderente ($DOc < DO \leq 2 \times DOc$), moderadamente aderente ($2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$) e fortemente aderente ($4 \times DOc < DO$).

3.2.8 Determinação dos grupos filogenéticos

Pelo método descrito por Clermont et al. (2013), foi realizada a classificação das amostras entre os sete principais grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E e F) com base na presença de três genes (*arpA*, *chuA* e *yjaA*) e uma sequência de DNA específica (TSPE4.C2). Os tamanhos amplicon e referências estão descritos na Tabela 2. Os três genes *arpA*, *chuA* e *yjaA* e o fragmento TSPE 4C2 foram testados individualmente para cada isolado. As reações continham 5 µL de DNA molde, extraído pelo método de Boom et al. (1990); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada um dos 4 dNTPs; 0,4 µM de cada *primer*; 1,5 u de Taq DNA polimerase em 10X de PCR Buffer e água mili-Q qsp. Após o ciclo de amplificação, que consiste de 94°C por 5 minutos e 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), anelamento (55°C à 30 segundos), extensão (72°C à 30 segundos) e 7 minutos a 72°C, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel agarose (1,5%), corados com SyBR Safe (Invitrogen®), visualizadas em transiluminador UV e fotografadas.

Tabela 2 Descrição dos genes utilizados para a classificação de grupos filogenéticos de *E. coli*, sequência dos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado

Fragmento	Gene	Sequência 5' – 3'	Fragmt (bp)	Referência
<i>arpA</i>	arpA.1	5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3'	400	Clermont, 2013 Clermont et al. (2000)
	arpA.2	5'-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3'		
<i>chuA</i>	chuA.1	5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3'	288	Clermont, 2013
	chuA.2	5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'		
<i>yjaA</i>	yjaA.1	5'-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3'	211	Clermont, 2013
	yjaA.2	5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'		
TspE4.C2	TspE4C2.1	5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3'	152	Clermont, 2013
	TspE4C2.2	5'-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3'		

3.2.9 Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)

A técnica utilizada para a realização do AFLP seguiu o protocolo descrito por McLauchlin et al. (2000), utilizando-se a endonuclease de restrição *HindIII* como úni-

ca enzima. A técnica consiste em três etapas: digestão ou restrição do DNA bacteriano, ligação de adaptadores de oligonucleotídeos (*primers* ADH1 e ADH 2) ao DNA digerido e amplificação seletiva com *primer* HI-G do DNA digerido ligado.

Para a clivagem ou restrição do DNA bacteriano, 10 µL de DNA extraído foram adicionados a um microtubo contendo 24U de *HindIII* (Invitrogen, São Paulo), tampão de enzima (1X) e 5,6 µL de H2O MilliQ®, perfazendo um volume final de 20 µL. O tubo foi incubado a 37°C por 12 a 18 horas.

Uma alíquota de 5 µL do DNA clivado ou digerido foi adicionado a um microtubo contendo 0,2 µg de cada adaptador (ADH1 e ADH2), 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen, Inc.), 4 µL tampão de T4 DNA-ligase e água ultrapura (H2O MilliQ®) até o volume final de 15 µL. Incubou-se essa reação à temperatura ambiente por três horas. O DNA ligado aos adaptadores foi aquecido a 80°C por 10 minutos. A sequência de bases dos *primers* (sequência dos adaptadores) utilizados para a ligação e amplificação e sua posição relativa ao sítio de restrição da enzima *HindIII* estão apresentadas na Quadro 2.

A PCR foi realizada utilizando-se 5 µL do DNA ligado diluído, MgCl₂ 5µL, *primer* (HI-G) 1,5 µL, Taq DNA polimerase 0,3 µL, tampão de PCR 1X e água até o volume final de 45 µL. A reação foi submetida à denaturação a 94°C por quatro minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 2,5 minutos a 72°C.

Quadro 2 – Sítio de restrição da enzima *HindIII*, adaptadores e sequência de *primers* para tipagem de *Escherichia coli* através da AFLP

1. Fragmento <i>HindIII</i>	5' AGCTT----//----A 3'
	3' A----//----TTCGA 5'
ADH1	5' ACGGTATGCGACAG 3'
2- Adaptador	
ADH2	3' GAG T GCC ATA CGC TGT CT CGA 5'
3- <i>Primer</i> específico HI-G	5' GGTATGCGACAGAGCTTX 3'

(1) Sítios de restrição da endonuclease *HindIII*, (2) Sequência dos dois oligonucleotídeos complementares que formam os adaptadores que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, (3) Sequência do *primer* utilizado na amplificação dos fragmentos. O G indica o local em que é inserida a base seletiva (A,T,G ou C).

A eletroforese foi realizada sobre um gel de agarose 2% (300 mL) a 24-35 V durante 26 horas. Os produtos amplificados foram corados com 2 µL GelRed™ (Uniscience). O gel foi fotografado pelo sistema "Image Master" (Amersham - Pharmacia Biotech). Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

Os níveis de parentesco dos isolados foram determinadas por meio da comparação de pares abrangentes de tamanhos de fragmentos de restrição, utilizando o coeficiente de Dice. Os valores médios obtidos a partir dos coeficientes dos dados foram empregados em UPGMA ("Unweighthd Pair-Group Method Using Arithmetic Average") usando BioNumerics 7,5 software (Applied Maths NV, Saint-Martens-Latem, Bélgica) para posteriormente serem gerado e representado sob a forma de dendograma. Os diferentes perfis foram formados por estirpes com mais de 90% de similaridade genética (VAN BELKUM et al., 2007).

3.2.10 Amplificação e sequenciamento dos genes *eae*, *bfpA* e *stx*

Os genes *eae*, *bfpA* e *stx* da estirpe CA14, foram amplificados por PCR. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Estados Unidos), empregando-se 2 µL do DNA da estirpe CA14, 20 pmoles de cada iniciador (*eae*, *bfpA* e *stx* –Tabela 1), e os seguintes reagentes da Invitrogen, Estados Unidos: 2 mM de MgCl₂, 200 nM de dNTPs, 1 U de *Platinum Taq DNA Polymerase*, tampão Tris-HCL (pH8,3) 1X e água ultrapura estéril em um volume final de 50 µL. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1%), visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e purificado com o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Reino Unido), de acordo com as recomendações do fabricante.

O fragmento purificado foi sequenciado empregando-se os oligonucleotídeos iniciadores *eae*, *bfpA* e *stx*. A amostra CA14 foi preparada conforme descrito em: <http://www.genoma.ib.usp.br/servicos/sequenciamento/produto-de-pcr-qualidade-e-quantificacao>. A reação de sequenciamento foi realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH-IB/USP). As sequências obtidas foram analisadas empregando-se as ferramentas de

bioinformática BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Amostras bacterianas

Das 171 amostras de fezes de psitacídeos de pequeno porte criados como *pets* de diferentes locais de manutenção, localizados na cidade de São Paulo/Brasil, foram identificadas 74/171 (45%) enterobactérias: 42 (57,54% - *E. coli*); 21 (28,77% - *Hafnia* sp); nove (12,33% - *Serratia* sp); e uma (1,36% - *Enterobacter* sp) (Quadro 3). Apenas um isolado não foi identificado pela metodologia empregada.

Quadro 3 – Percentual de detecção de positividade das Enterobactérias das espécies avaliadas e resultados positivos para *E.coli* obtidos a partir de cultura de excretas cloacais de Calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) e agapornis (*Agapornis* spp) de diferentes locais de manutenção.

	Calopsitas	Periquitos	Agapornis	Isolados	%
<i>E. coli</i>	22	10	10	42	57,54
<i>Hafnia</i> sp.	05	04	12	21	28,77
<i>Serratia</i> sp.	02	02	05	09	12,33
<i>Enterobacter</i> sp.	00	01	00	01	1,36
<i>Não identificada</i>				01	
Total				74	100
Espécies		Locais de manutenção		<i>E. coli</i>	
		<i>Pet shop</i>	Clínica	Proprietário	+
Calopsita (<i>Nymphicus hollandicus</i>)		17 (53%)	05 (31%)	00 (0%)	+
Periquito (<i>Melopsittacus undulatus</i>)		06 (22%)	01 (33%)	03 (10%)	+
Agapornis(<i>Agapornis</i> spp)		09 (21%)	01 (50%)	00 (0%)	+
Total					42

Das 74 amostras de enterobactérias, 42 foram positivas para *E. coli* (57,54%), proveniente de 22 calopsitas (52,38%), 10 periquitos australianos (23,81%) e 10 agapornis (23,81%).

3.3.2 Determinação dos fatores de virulência através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para a detecção dos fatores de virulência, utilizou-se a técnica de PCR, pesquisando dez genes: STEC (*stx1* e *stx2*); EPEC (*eae* e *bfp*); ETEC (LT, ST); e EaggEC (MTPX – *aggR* ; *aaiA* ; *aatA* ; *aaiG*). Os resultados apontaram positividade em dez isolados: *eae*⁺, *bfpA*⁺, *Stx2*⁺ de três calopsitas e cinco periquitos australianos (8/10 – 80%); ST de uma calopsitas (1/10 – 10%) e *eae*⁺ de um periquito australiano (1/10 – 10%): conforme ilustra o Quadro 4

Quadro 4 – Fatores de virulência pesquisados pela reação em cadeia pela polimerase para identificação de *E. coli* diarreio gênicas de relevância epidemiológica: EPEC, STEC, ETEC e EAEC

Isolado	Bactéria	Cadeia pela polimerase (PCR)						
		<i>eae</i>	<i>bfpA</i>	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	LT	ST	<i>aggR</i> +, <i>aaiA</i> +, <i>aatA</i> +, <i>aaiG</i>
CA 12	<i>E. coli</i>	+	+	-	+	-	-	-
CA 14	<i>E. coli</i>	+	+	-	+	-	-	-
CA 35	<i>E. coli</i>	+	+	-	+	-	-	-
CA 38	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	+	-
PA 08	<i>E. coli</i>	+	+	-	+	-	-	-
PA 24	<i>E. coli</i>	+	+	-	+	-	-	-
PA 37	<i>E. coli</i>	+	-	-	-	-	-	-
PA 56L+	<i>E. coli</i>	+	+	-	+	-	-	-
PA 56L-	<i>E. coli</i>	+	+	-	+	-	-	-
PA 58	<i>E. coli</i>	+	+	-	+	-	-	-

3.3.3 Amplificação e sequenciamento dos genes *eae*, *bfpA* e *stx*

Como não existe relato na literatura de estirpes com genótipo *eae*⁺, *bfpA*⁺ e *stx2*, optou-se pela confirmação por meio de sequenciamento. Uma amostra (CA14) foi encaminhada para o Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH-IB/USP), confirmando, então, o resultado da amostra CA14: *eae*⁺, *bfpA*⁺ e *stx2*⁺ (ANEXO I).

3.3.4 Determinação do Sorogrupo

Para a determinação dos antígenos O e H, uma amostra (CA14) foi encaminhada para sorotipagem em Laboratório de referência (STATENS SERUM INSTITUT - Department of Microbiology & Infection Control - Copenhagen) com resultado inconclusivo, conforme (ANEXO J). Optou-se, então, pelo encaminhamento dos dez isolados para o Instituto Adolfo Lutz. Oito estirpes foram classificadas como O137:HNM (CA12, CA14, CA35, PA8g, PA24, PA56L+, PA56L- e PA58) uma O137:H6 (PA37), e uma outra como O166:H49 (CA38). Nenhum dos isolados de STEC pertenciam ao sorogrupo O157.

3.3.5 Perfil de resistência

A maior parte das estirpes foram classificados como sensíveis aos 18 antibióticos testados. Apenas uma estirpe de uma calopsita, foi resistente sulfametoxazol-trimetoprim. As estirpes dos periquitos foram resistentes a sulfametazina (1/5) e estreptomicina (1/5). Nenhuma das estirpes exibiram um perfil de multirresistência (ANEXO L).

3.3.6 Ensaio de Formação de Biofilme

A capacidade de formação de biofilme dos isolados de *E. coli* do presente estudo foi estratificada de acordo com Stepanović et al. (2000). Apenas o isolado PAR56L+ foi positivo para formação de biofilme (DO de 0,064), sendo classificado como fracamente aderente. Os outros isolados foram considerados não formadores de biofilme, apresentando DO entre 0,030 a 0,060.

Gráfico 1 – Resultado dos ensaios de formação de biofilme de *E. coli* isoladas de psitacideos *pet*

3.3.7 Determinação dos grupos filogenéticos

As amostras foram classificadas em um dos grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D, E e F de acordo com a interpretação dos resultados das PCRs, segundo dendograma, apresentado no Quadro 5.

A análise filogenética, de acordo com o novo método *phylotyping* descrito por Clermont em 2013, classificou três estirpes como B2, duas como F, e uma como Clado II. Duas estirpes foram classificadas como “não tipável”.

Os resultados de AFLP são mostrados na Quadro 5. Sete estirpes (três de calopsitas e quatro de periquitos) foram agrupadas em um mesmo *cluster*, apresentando 90-100% de similaridade. Apenas uma estirpe isolada de um periquito mostrou um padrão de banda diferente e foi classificada em um único *cluster*, com similaridade abaixo de 70%.

Quadro 5. Dendograma gerado a partir da análise de AFLP de isolados de *E. coli* isoladas de psitacídeos

3.4 DISCUSSÃO

Das 42 estirpes avaliadas, 19,04% (8/42) foram classificadas como STEC. Sob o ponto de vista do risco zoonótico, nosso trabalho se destaca pelo fato da elevada frequência de STEC nestas aves.

Em todas as estirpes, encontramos os fatores de virulência positivos para os genes *eae*, *stx2* e, surpreendentemente, *bfpA*. Isto não seria compatível com STEC, pois este patotipo não expressa *bfpA*, característico de EPEC típica, sugerindo que estes isolados sejam híbridos de patotipos distintos. Muniesa et al. (2012) estudaram um surto de diarreia em humanos, causado por *E. coli* (STEC) presentes em pepinos. O sequenciamento genético da estirpe isolada detectou o gene que codifica fatores de virulência de EaggECs. Apesar desses fatores serem carregados por plasmídeo pAA, este surto epidêmico adquiriu fagos lambdoides carregando genes para a toxina Shiga, evidenciando a hibridização entre os dois patotipos.

Existem pelo menos 100 sorotipos de *E. coli* que são capazes de produzir toxinas Shiga (NATARRO; KAPER, 1998). A maioria dos casos de doença humana são causadas por estirpes enterohemorrágicas (EHEC) do sorotipo O157:H7, reconhecida pelos microbiologistas desde 1982 (Law, 2000). Porém, outros sorogrupos, como o O26, O111, O103 e O145, também têm sido relatados como causa da doença. Estas estirpes são agora mencionadas como não-O157 EHEC (NATARRO; KAPER, 1998). Em nosso estudo não foi possível a identificação do sorogrupo pelo Laboratório de referência – STATENS SERUM INSTITUT (Department of Microbiology & Infection Control - Copenhagen). Porém, quando encaminhado ao Instituto Adolfo Lutz, obtivemos os resultados das dez estirpes. Oito (CA12; CA14; CA35; PA24; PA56 L-; PA88; PAR56 L+; PAR58;) foram classificadas O137:HNH; uma (CA38) O166:H49 e outra (PA37) como O137:H6. Nenhuma das amostras estudadas pertencia ao sorotipo O157:H7. Estes dados são compatíveis com os descritos por Law (2000) que afirma que a frequência de isolamento de não-O157 STEC de alimentos e fezes de animais é mais elevada que as de *E. coli* O157:H7. É importante ressaltar que os seres humanos estão cada vez mais expostos aos sorogrupos não-O157 STEC de fontes de alimentos como carnes, leite e queijo, bem como, a estreita relação com animais domésticos, *pets* e ambiente contaminado por fezes. Pelo fato

desses animais permanecerem muitas vezes assintomáticos, é importante a detecção do agente em função de potencial zoonótico.

A STEC tem origem zoonótica definida. O gado é o seu principal reservatório, sendo esta estirpe altamente virulenta para os seres humanos, em particular a EHEC O157. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) constitui um subconjunto de sorotipos de STEC que têm sido associados com colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU), em países industrializados (CAPRIOLI et al., 2005). A STEC pode ser transmitida a partir de reservatórios animais para os seres humanos, não só por meio da ingestão de alimentos contaminados ou água potável, como por contato com animais STEC-positivo ou com o seu ambiente (CAPRIOLI et al., 2005). As infecções causadas por STEC foram descritas em várias espécies de animais domésticos e selvagens, mas o seu papel patogênico tem sido mais evidenciado em vitelos jovens (diarreia ou disenteria), leitões desmamados (doença do edema) e cães (KRAUSE et al., 2005).

Apesar da vasta quantidade de dados disponíveis em relação à presença de *E. coli* patogênica em diferentes mamíferos, em aves hospedeiras as pesquisas são bem mais limitadas. Segundo Chandran e Mazumder (2014), a ocorrência de STEC O157 (Wallace et al., 1997) e não-O157 (Kobayashi et al., 2009), tem sido detectada em algumas aves selvagens na Europa, Japão e Estados Unidos. Porém, estes estudos foram realizados apenas em gaivotas e pombos. Eles sugerem que bactérias fecais de fontes aviária e a consequente deterioração da qualidade da água possuem uma correlação significativa entre o número de aves e a concentração *E. coli*. Relata, ainda, que outros estudos foram realizados no Canadá, com material fecal aviário, com 30 a 60% de *E. coli* presente nas areias de praia e águas de superfície.

Algumas aves selvagens e sinantrópicas convivem com humanos e outras migram entre jardins, mercados, pastagens, fazendas de gado e suínos ou em ambiente doméstico. Essa interação entre seres humanos e aves selvagens facilita a propagação de infecções zoonóticas e pode contribuir para a dispersão de estirpes resistente a antibióticos (KOBAYASHI et al., 2009; SAYAH et al., 2005; SACRISTAN et al., 2014). De acordo com Gibbs et al. (2007) estudar populações aviárias que não são tipicamente expostas a antimicrobianos, pode ser uma das maneiras de entender a resistência bacteriana, uma vez que estas aves podem entrar em contato com aves domésticas, facilitando, assim, a transferência direta de agentes infecciosos e genes de resistência a antibióticos, especialmente para as aves de quintal (SA-

CRISTAN et al., 2014). Isolados de *E. coli* de animais e humanos possuem muitos genes em comum. Alguns autores sugerem que, quando estirpes diferentes entram em contato, existe a possibilidade de trocas genéticas entre as mesmas, e consequentemente, a probabilidade de surgimento de um patógeno emergente (KUHNERT et al., 2000). Alterações na resistência ou a aquisição de fatores de virulência associados na *E. coli* comensal podem servir como um alerta para aparecimento de resistência em bactérias com potencial patogênicos (IKUNO et al., 2008).

Amostras de *E. coli* isoladas de animais já são resistentes à maioria dos antimicrobianos comumente usados, como as tetraciclinas, sulfametoxazol, ampicilina, estreptomicina e carbenicilina (KANG et al., 2005). A resistência por *E. coli* a pelo menos duas classes de agentes antimicrobianos é um achado comum na atualidade, fato que restringe as opções terapêuticas (SAMUEL et. al., 2014). O fenótipo de resistência a antibióticos desse estudo foi detectado em 3/8 (37,5%) dos isolados de STEC, com um isolado resistente a sulfatrimetorpim, um isolado resistente sulfame-tazina e um isolado resistente a estreptomicina e ceftiofur. Não foi detectada a ocorrência do fenótipo de multirresistência (resistência a mais de três classes distintas).

O resultado para o ensaio de biofilme revelou que apenas um isolado de *E. coli* proveniente de periquito australiano (PA56L+) apresentou formação de biofilme, mas de baixa intensidade. Deve-se levar em consideração que a associação de bactérias patogênicas em biofilmes é considerada um fator importante para a sua capacidade de causar doença no hospedeiro (DANESE et al., 2000), além de poder conferir resistência à ação de alguns antimicrobianos e desinfetantes, tendo sido descritas em isolados de EAEC (SHEIKH et al., 2001), EPEC atípica (CULLER et al., 2014), STEC (BISCOLA; ABE; GUTH, 2009), EHEC (RYU; BEUCHAT, 2004), ETEC (SHERLOCK; VEJBORG; KLEMM, 2005) e DAEC (SHERLOCK et al., 2004).

Por vários anos, as pesquisas para determinação de grupos filogenéticos, foram utilizadas por pesquisadores para diferenciar linhagens extraintestinais e virulentas de *E. coli* (grupos B2 e D) e linhagens comensais (grupos A e B1) utilizando a PCR multiplex para a detecção dos genes *chuA* (gene de transporte heme), *yja* (gene de função desconhecida de *E. coli* K12) e Tsp. E4C2 (fragmento de DNA de STEC). Estes grupos parecem diferir em importantes aspectos relacionados à biologia de suas populações microbianas (CLERMONT et al., 2000). Com o crescente estudo dos dados de sequências multi-lócus e do genoma para *E. coli* refinou-se a compreensão da estrutura filogrupos de *E. coli* e oito filogrupos são agora reconheci-

dos (Clermont, 2013): sete (A, B1, B2, C, D, E, F) pertencem a *E. coli stricto sensu*, ao passo que a oitava é a *Escherichia* enigmática clade I. Segundo Clermont (2013) o método de atribuição estendida filogrupos quádruplo PCR parece oferecer várias vantagens significativas sobre o método de PCR triplex anterior. Foram mantidos os mesmos genes alvos originais de *chua*, *yjaA* e *TspE4.C2*, e adicionado um gene alvo, *arpa*, fazendo assim, um novo método de PCR quádruplo. A inclusão de *arpa* permite estirpes pertencentes ao filogrupos F, anteriormente identificado erroneamente como cepas D (+ *chua*, *yjaA* -, *TspE4.C2* -), a ser distinguido, pois *arpa* está presente em todas *E. coli* com as exceções de estirpes pertencente aos filogrupos B2 e F assim como, está ausente em clados críticos II, III, IV, V, e também na *Escherichia albertii* e *Escherichia fergusonii*.

Os oito isolados de STEC incluídos neste estudo foram caracterizados quanto ao grupo filogenético e ao polimorfismo do tamanho dos fragmentos amplificados (AFLP). O critério de agrupamento filogenético seguiu recomendações prévias do novo método de PCR quádruplo de Clermont (2013), promovendo a identificação do novo filogrupos F de dois isolados de periquitos australianos, mantendo padrão *arpa* negativo. Em um isolado, também de periquito australiano, o resultado foi Clado II. Em dois isolados de periquitos e de uma calopsita foram classificados no grupo B2, sendo considerados grupo pertencente às linhagens mais virulentas. Segundo Clermont (2013) algumas linhagens ainda não puderam ser identificadas, o que ocorreu em dois isolados de calopsitas deste estudo.

A análise clonal de amostras de *E. coli* por meio da técnica de Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP) tem sido amplamente empregada em inquéritos epidemiológicos (KNÖBL et al., 2012) para a diferenciação de espécies bacterianas importantes, por identificar mutações dispersas no genoma. Geornaras et al. (2001) empregou AFLP convencional em um estudo com 50 *E. coli* isoladas de carcaças de frangos de corte, observando 41 padrões distintos com pouca similaridade, o que sugere a ausência de relação clonal entre carcaça e estirpes fecais. Em nosso estudo, com aves de cativeiro, houve similaridade entre 90 a 100% em todas as amostras, com exceção de uma amostra isolada de periquito que foi classificada em um *cluster* com menos de 70% de similaridade. Segundo o protocolo de McLauchlin (2000), essa seria a melhor linha de corte para se considerar similaridade. Nossas amostras eram de origem diferente (*pet shops*, clínicas ou, ainda, proprietários particulares), alojadas de formas diferentes (gaiolas individuais, co-

letivas ou soltas no ambiente doméstico) e apresentaram muitos traços fenotípicos e genotípicos idênticos, sendo a origem comum a explicação mais provável. Análise de eventos moleculares que levam à polimorfismo genômico em condições naturais e experimentais devem ser reconhecidas para aumentar a compreensão dos mecanismos evolutivos de clones bacterianos e de como eles se espalham em populações humanas.

As zoonoses e as doenças transmissíveis comuns aos homens e aos animais continuam registrando altas taxas de incidência em todos os países, principalmente nos em desenvolvimento, causando significativa morbidade e mortalidade (ACHA; SZYFRES, 2001). É fundamental a identificação de agentes etiológicos e do risco que representam para coleções de animais em cativeiro. Isso permite intervir sobre os fatores envolvidos, controle de enfermidades e a conservação das espécies e da saúde pública. Estabelecimentos de animais *pets* poderiam desempenhar um papel importante no controle de infecções zoonóticas de animais de companhia. É o ponto inicial do contato com *pets* e é onde o público poderia acessar informações e adquirir orientações sobre os riscos associados aos seus animais de estimação recém-adquiridos.

Devido à crescente procura de psitacídeos como animais de estimação, principalmente por crianças e adolescentes, são necessários mais estudos sobre os riscos zoonóticos relacionados às aves de estimação.

3.5 CONCLUSÕES

- Neste estudo foram identificados isolados potencialmente zoonóticos com positividade para os genes *eae*, *bfpA* e *stx2* em calopsitas e periquitos.
- As estirpes com este perfil genotípico pertenciam ao sorogrupo O137.
- Nos ensaios fenotípicos não foi observada elevada capacidade de formação de biofilme e resistência múltipla a antibióticos.
- A classificação filogenética alerta para a presença de estirpes virulentas do filogrupo B2.
- Devido à crescente procura de psitacídeos como animais de estimação, principalmente por crianças e adolescentes, e em função dos resultados positivos para STEC deste estudo, são necessários mais pesquisas sobre a caracterização genotípica e dos riscos zoonóticos relacionados às aves de estimação.

REFERÊNCIAS

ABEELE, D. V. D. **Agapornis**. Editorial HISPANO EUROPEA; 2012. ISBN 978-84-255-1688-7. p. 13.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Organizacion Panamericana de la Salud, 3nd ed., Columbia, v.1, p. 418, 2001

AFSET, J. E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonge diarrhea. **J. Med. Microbiol.**, n. 53, p. 1137-44, 2004.

ANDERSEN, A. A.; VANROMPAY, D. Avian Clamidiose: **Rev Sci Tech**. v.19, n. 2, p. 396-404, 2000.

ANDRADE, F. B.; GOMES, T. A.; ELIAS, W. P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Microbiol Methods**. v.106:16-8, 2014.

ANDREATTI FILHO, L. R. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, v. 10p. 112-17, 2007.

ANVISA, Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria 2014. Principais Síndromes infecciosas Disponível em http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/microbiologia/mod_1_2004.pdf Acesso em 29 set 2016.

ARANDA, K. R. S.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I. C. A. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enterroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in brazilian children, FEMS – (Federation of European Microbiological Societies). **Microbiology Letters**, n. 267, p. 145–50, 2007.

BARDIAU, M.; SZALO, M.; MAINIL, J. G. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. **Vet. Res.**,v. 41:57, 2010.

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: SAIF, Y.M. (Ed.). **Diseases of poultry**. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, v.18, p. 631-52, 2003.

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD; SWAYNE, L. R. D. E. **Diseases of Poultry**. Ames, EUA: Iowa State University, p. 631-56, 2004.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, p.455-69, 2009.

BERTÃO, A. M. S.; SARIDAKIS, H. O. 2007. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 81-92, jul./dez. 2007.

BISCOLA, F. T.; ABE, C. M.; GUTH, B. E. Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 77, p. 2201-8, 2011.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIN-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.

CALDORIN, M.; DE ALMEIDA, I. A. Z. C.; PERESI, J. T. M.; ALVES, E. C. 2013 Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **BEPA Boletim epidemiológico paulista**.10(110):4-20 Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicoes-2013/bepa_110.pdf.> Acesso em: 25 set 2016.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res**, v. 36, p. 289–311, 2005.

CARVALHO, V. M.; GYLES, C. L.; ZIEBELL, K.; RIBEIRO, M. A.; CATÃO-DIAS, J. L.; SINHORINI, I. L.; OTMAN, J.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Characterization of monkey entero- pathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 1225–1234, 2003.

CARVALHO, A. F.; MIYASHIRO, S.; NASSAR, A. F. C.; NODA, A.; GABRIEL, D. T.; BALDASSI, L. Caracterização molecular e fenotípica de estirpes de *Escherichia coli* produtoras de shiga-toxina (STEC) não-O157 de fezes e carcaças bovinas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 4, p. 881-886, 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *E. coli (Escherichia coli)*. 2014. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>. Acesso em 5 set 2016.

CHANDRAN, A.; MAZUMDER, B. Occurrence of diarrheagenic virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various avian hosts in British Columbia, Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1933–40, 2014.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J.; CONSTANTINOU, K.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, p. 71–87, 2012.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, p. 4555-58, 2000.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylotyping method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environ. Microbiol. Rep.** v. 5, n. 1, p. 58-65, 2013.

CLERMONT, O.; GORDON, D.; DENAMUR, E. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology**, v. 161, p. 980-8, 2015.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M31-A3**: performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3rd ed., Wayne, PA, USA: Clinical And Laboratory Standards Institute, 2008.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M100-S23**: performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third ed. document. Wayne, PA, USA: Clinical And Laboratory Standards Institute, 2013.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesq Vet Bras.** v. 34, n. 9, p. 811-8, 2014.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity nature reviews. **Microbiology**, v.8. 2010.

CULLER, H. F.; MOTA, C. M.; ABE, C. M.; ELIAS, W. P.; SIRCILI, M. P.; FRANZOLIN, M. R. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. **Biomed Res Int.** 2014:845147, 2014.

D'ARI, R.; SEZONOV, G. 2014. **Os organismos-modelo: Biologia e Genética da *Escherichia coli***. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 408p.

DANESE, P. N.; PRATT, L. A.; KOLTER, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. **Journal of Bacteriology**, Boston, v. 182, n. 12, p. 3593-3596, mar, 2000.

ESCHERICH, T. Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. **Fortshr. Med.**, v. 3, p. 515-522, 1885.

ELIAS, W. P.; BARROS, S. F.; MOREIRA, C. G.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A. Enteropathogenic *Escherichia coli* strains among classical enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroups. **J Clin Microbiol.**, v. 40, n. 9, p. 3540-1, 2002.

ELIZEIRE, M. B. **Expansão do mercado pet e a importância do marketing na medicina veterinária, Faculdade Federal do Rio Grande do Sul.** 2013. 53f..

FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, E. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. **Revue scientifique et technique**, v. 25, n. 2, p. 555-569, 2006.

FALLACARA, D. M.; MONAHAN C. M.; MORISHITA T. Y.; WACK R. F. Fecal shedding and antimicrobial susceptibility of selected bacterial pathogens and a survey of intestinal parasites in free-living waterfowl. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 45, n.1, p. 128- 135, 2001.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI JR., A.; MACARI, M. **Doença das aves**. Campinas: Facta, 2000.

FERREIRA, G. M. **Regulação da adesão de *Escherichia coli* enteropatogenica (EPEC) por genes de resposta à limitação nutricional e estresse**. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de doutor em ciências (Microbiologia). 2009 168 p.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. In: JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2009. cap.4, p. 457-474.

FOCACCIA, R. V. **Tratado de Infectologia**. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 984-989, 2005.

FORSHAW, J. M.; COOPER, W. T. **Parrots of the World**. Australia: T.F. H. Publications, 1977. p. 263-265.

FOTIN, C. M. P. **Levantamento prospectivo dos animais silvestres, exóticos e domésticos não convencionais, em cativeiro domiciliar, atendidos em clínicas particulares no município de São Paulo: aspectos do manejo e principais afecções**. 2005. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FRANZIN, F. M.; SIRCILI, M. P. Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. **BioMed Research International** .2015, Article ID 534738, 10 pages.

GEORNARAS, J.; HASTINGS, W., HOLY, A. V. Genotypic analysis of *Escherichia coli* strains from poultry carcasses and their susceptibilities to antimicrobial agents," **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1940–1944, 2001.

GIBBS P. S. ; KASA R. ; NEWBREY J. L. ; PETERMANN S. R. ; WOOLEY R. E. ; VINSON H. M. ; REED W. Identification, antimicrobial resistance profiles, and virulence of members

from the family Enterobacteriaceae from the feces of yellow-headed blackbirds (*Xanthocephalus xanthocephalus*) in North Dakota. **Avian Diseases**, v. 51, p.649-655, 2007.

GODOY, S.N. **Patologia comparada de psitacídeos mantidos em cativeiro no Estado de São Paulo**, 2001. 214 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R. A Survey of Diseases in Passeriform birds obtained from illegal wildlife trade in São Paulo City, Brazil. **J. Avian Med. Surg.** v. 24, p. 199-209, 2010.

GOMES, M. S. **Implantação de medidas profiláticas no Zoológico do Município de São Bernardo do Campo: uma análise de custo - benefício**. 2002. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

GOMES, T. A. T.; IRINO, K.; GIRÃO, D. M.; GUTH, B. E. C.; VAZ, T. M. I.; MOREIRA, F. C.; CHINARELLI, S. H.; VIEIRA, M. A. M. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerg. Infect. Dis.**, n. 10, p. 1851-1855, 2004.

GOOSNEY, D.; DEVINNEY, R.; PFUETZNER, R.; FREY, E.; STRYNADKA, NC.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actin. **Curr Biol** v. 10, p. 735-738, 2000.

GOULART, C. E. S. Descrição de um surto de Clamidiose aviária em psitacídeos silvestres brasileiros. In: V Congresso e X Encontro da Associação de Veterinários de Animais Selvagens. **Anais**. São Paulo/S.P., 2001. p.28.

GRESPLAN, A. **Clamidiose em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*): perfil do proprietário e ensaio terapêutico**, 2010. 111f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Epidemiologia aplicada ao estudo das zoonoses. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo.

GUIMARÃES, M. B. **Passeriformes**. 2006. In: Cubas, Z.S.; Silva, G.C.R.; Catão-Dias, J.L. Tratado de Animais Selvagens. São Paulo. Rocca. 324-339.

GUINÉE, P. A. M.; JANSEN, H. W.; WADSTROM, T.; SELLWOOD, R. "*Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves," in Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea: **Current Topics in Veterinary and Animal Science**, v. 13, eds P. W. De Leew and P. A. M. Guinée (Hague: Martinus Nijhoff), p. 126–162, 1981.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, G. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4d. Iowa: Blackwell Publishing,. cap. 15, p. 266- 308. 2010.

- HACKER, J.; CARNIEL, E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. **EMBO reports**. v. 22, p. 376-81, 2001.
- HARCOURT-BROWN, N. H. Aves Psittaciformes. In.: TULLY, T. N; DORRESTEIN, G. M; JONES, A. K. **Clínica de aves**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.122-149.
- HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, M. A. M.; GOMES, T. A. T. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** 297, p. 137–149, 2009.
- HERNANDES, R.T.; DE LA CRUZ, M.A.; YAMAMOTO, D.; GIRÓN, J.A.; GOMES, T.A. Dissection of the role of pili and type 2 and 3 secretion systems in adherence and biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect Immun.**, v. 81, p. 3793-3802, 2013.
- HIRSH, D. D. *Escherichia coli*. In: _____. **Microbiologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Granabara Koogan SA, 2003. cap. 9, p. 63-69.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. 1994. Determinatively anaerobic Gram-Negative rods. In: Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. (Eds). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 75-289.
- HU, J.; TORRES, A. G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander?, **Clin Microbiol Infect**, v. 21, p. 729–734, 2015.
- IOC World Bird List, 2016. Disponível em: <http://www.worldbirdnames.org/ioc-lists/family-index/>. Acesso em 26 agosto 2016.
- IKUNO, A. A.; GAMA, N. M. S. Q.; GUASTALLI, E. A. L.; GUIMARÃES, M. B.; FERREIRA, V. C. A. 2008. Características de isolados de *Escherichia coli* provenientes de aves silvestres quanto a genes de virulência e resistência a antibióticos. **Anais 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado. 2008.
- JORIS, M. A.; VANROMPAY, D.; VERSTRAETE, K.; REU, K.; ZUTTER, L.; COX, E. Use of antibody responses against locus of enterocyte effacement (LEE) – Encoded antigens to monitor enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections on cattle farms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.79, n.12, p. 3677-3683, 2013.
- KANG, H.Y.; JEONG, Y.S.; OH, J.Y.; TAE, S.H.; CHOI, C.H.; MOON, D.C.; LEE, W.K.; LEE, Y.C.; SEOLI, S.Y.; CHO, D.T.; LEE, J.C. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.55. p 639-644, 2005.

KAPER J. B.; NATARO J. P.; MOBLEY H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews.**, v. 2, p. 123–140, 2004.

KARIUKI, C.; GILKS, J.; MUYODI, J.; GETTY, B.; HART, A. Carriage of potentially pathogenic *Escherichia coli* in chickens. **Avian Diseases**, Kennet Square, v. 46, n. 3, p. 721-724, 2002.

KAUFFMANN, F. The serology of the Coli group. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 57, p. 71-100, 1947.

KOBAYASHI, H.; KANAZAKI, M.; HATA, E.; KUBO, M. 2009. Prevalence and characteristics of eae- and stx- positive strains of *Escherichia coli* from wild birds in the immediate environment of Tokyo Bay. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 75, p. 292–295, 2009.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a re-servoir for intimin (eae) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 1-2, p. 87-95, 2005.

KNÖBL, T.; GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R.; GUIMARÃES, M. B.; FERREIRA, A. J. P. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. **Braz. J., Res. Anim. Sci.**, São Paulo. v. 45, suplemento, p.54-60, 2008.

KNÖBL, T.; SAIDENBERG, A. B. S.; MORENO, A. M.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; LEITE, D. S.; BLANCO, J. E.; FERREIRA, A. J. P. Serogroup and virulence of *Escherichia coli* isolated from psittacine birds. **Pesq. Vet. Bras**, v. 31, p. 916-921, 2011.

KNÖBL, T.; MORENO, A. M.; PAIXÃO, R.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; LEITE, D. S.; BLANCO, J. E.; FERREIRA, A. J. P.; 2012. Prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) clone harboring sfa gene in Brazil. **Sci. World J.** v. 7, 2012.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n.1, p.107-117, 2000.

LAI, Y.; ROSENSHINE, I.; LEONG, J. M.; FRANKEL, G. Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.** v. 15, n. 11, p. 1796–1808, 2013.

LAW, D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin- producing *E. coli*. **J. Appl. Microbiol.** v. 88, p. 729–745, 2000.

MAINIL, J. 2013. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1-2, p. 2–12, 2013.

MARIETTO-GONÇALVES, G. A.; ALMEIDA, S. M.; RODRIGUES, J. Presence of a Human Diarrheagenic *Escherichia coli* Clone in Captivity Kept Psittacidae. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, (Suppl 1-M4), p. 72-75, 2011.

MARTINS, F. H.; GUTH, B. E. C.; PIAZZA, R. M.; LEÃO, S. C.; LUDOVICO, A.; LUDOVICO, M. S.; DAHBI, G.; MARZOA, J.; MORA, A.; BLANCO, J.; PELAYO, J. S. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Parana' State, southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 175, p. 150–156, 2015.

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. **Arq Inst Biol**; v.72. n.1, p.13-6, 2005.

MAZUMDER, A. C. Occurrence of diarrheagenic virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various avian hosts in British Columbia, Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1933-1940, March 2014.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRET, M.M.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **Int. J. Food Microbiol.** v. 56, p. 21–28, 2000.

MELTON-CELSA, A. R. 2014. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. **Microbiol Spectrum**, v. 2, n. 3, EHEC-0024, 2013.

MENDES, C. G.; LEITE, A. I. Conhecimento dos jovens de centros urbanos acerca das zoonoses. In: Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária, Guarapari, 2003. **Anais...** Guarapari, 2003, I - 27- 30 nov., 2005. 1 CD-ROM.

MORA, A.; BLANCO, M.; YAMAMOTO, D.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E., LÓPEZ, C.; ALONSO, M. P., VIEIRA, M. A. M., HERNANDES, R. T., ABE, C. M., PIAZZA, R. M. F., LACHER, D. W., ELIAS, W. P., GOMES, T. A. T., BLANCO, J. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different eae and tir alleles. **International Microbiology**, v. 12, p. 243-251, 2009.

MORA, A.; LÓPEZ, C.; DHABI, G.; LÓPEZ-BECEIRO, A. M.; FIDALGO, L. E.; DÍAZ, E. A.; MARTÍNEZ-CARRASCO, C.; MAMANI, R.; HERRERA, A.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. Seropathotypes, Phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 8, p. 2578-85, 2012.

MORENO, A. M.; KNÖBL, T. Análise filogenética de *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC) e produtoras de toxina shiga (STEC) isoladas de fezes de psitacídeos: avaliação do potencial zoonótico. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n. 1, 2015.

MORIN, N.; TIRLING, C.; IVISON, S. A. M.; KAUR, A. P.; NATARO, J. P.; STEINER, T. S. Autoactivation of the AggR regulator of enteroaggregative *Escherichia coli* in vitro and in vivo. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 58, p. 344-55, Apr 2010. ISSN 3.

MUNIESA, M.; HAMMERL, J. A.; HERTWIG, S.; APPEL, B.; BRÜSSOW, H. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4: a New Challenge for Microbiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4065–4073, 2012.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 207.

NAKAZATO, G.; CAMPOS, T. A.; STEHLING, E. G.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W. D. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479–486, 2009.

NARA, J. M.; CIANCIARULLO, A. M.; CULLER, H. F.; BUERIS, V.; HORTON, D. S. P. Q.; MENEZES, M. A.; FRANZOLIN, M. R.; ELIAS, W. P.; PIAZZA, R. M. F. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of *bundle forming pilus* expression. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 35-43, 2010.

NATARO, J. P.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E.; BRAVO, N.; LEVINE, M. M. "Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe," **Journal of Infectious Diseases**, v. 152, n. 3, p. 560-565, 1985.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, EUA. v.11, n.1, p.142-201, 1998.

PAL, A.; GHOSH, S.; RAMAMURTHY, T.; YAMASAKI, S.; TSUKAMOTO, T.; BHATTACHARYA, S. K.; NAIR, G.; TAKEDA, Y. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta, India. **Indian J. Med. Res.** v. 85, 1999.

PERUGINI, M. R. E.; VIDOTTO, M. C. 1992. Características clínicas e virulência de *Escherichia coli* do trato urinário. **Seminário Ci. Biol./Saúde**, Londrina, v. 13, n. 2, p.33-39, jun 1992.

PRUIMBOOM-BREES, I. M.; MORGAN, T. W.; ACKERMANN, M. R.; NYSTRO, E. D.; SAMUEL, J. E.; CORNICK, N. A.; MOON, H. W. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. **PNAS**, v. 97, n. 19, 2000.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1a ed. Porto Alegre: editora Artmed 512p, 2005.

RASO, T. F.; GODOY, S. N.; MILANELO, L.; SOUZA, C. A. I.; MATUSCHIMA, E. R.; ARAÚJO JR, J. P.; PINTO, A. A. An outbreak of chlamydiosis in captive blue-fronted amazon par-

rots (*Amazona aestiva*) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, n. 1, p. 94–96, 2004 Copyright 2004 by American Association of Zoo Veterinarians.

REGUA-MANGIA, A. H.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R. C.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L. M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Infect.**, n. 48, p. 161-167, 2004.

REPLE, J. N.; OLIVEIRA, M.C.V.; OLIVEIRA, M.G.X.; CUNHA, M.P.V.; GIOIA-DI CHIACCHIO, R. M.; SANCHES, L.A.; SAIDENBERG, A.B.S.; MORENO, L.Z.; ROCHA, L. B.; OZAKI, C. Y.; HORTON, D. S. P. Q.; MENEZES, C. A.; SILVA, A.; FERNANDES, I.; MAGNOLI, F.; VAZ, T. M. I.; GUTH, B. E. C.; PIAZZA, R. M. F. Different Assay Conditions for Detecting the Production and Release of Heat-Labile and Heat-Stable Toxins in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates. **Toxins** 2013, 5, 2384-2402; doi:10.3390/toxins5122384.

RODRIGUES, D. P.; THEOPHILO, G. N. D.; REIS, E. M. F.; LAZARO, N. S. Doenças de Transmissão Alimentar: Aspectos Clínicos, Coleta e Transporte de Material. Instituto OswaldoCruz /FIOCRUZ, Lab. Ref. Nacional Cólera e outras Enteroinfecções. **Man. Lab. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ**, 2008. 27p.

ROSSKOPF, W.J.; WOERPEL, R.W. **Diseases of Cage and Aviary Birds**. IN: FUDGE, A. M. Avian Clamidiose. 3ª ed. USA: Williams & Wilkins, 1996. Cap. 44, v. 1, p. 572-585.

RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 247-254, 2004.

SACRISTÁN, C.; ESPERÓN, F.; HERRERA-LEÓN, S.; IGLESIAS, I.; NEVES, E.; NOGAL, V.; MUÑOZ, M. J.; DE LA TORRE, A. Virulence genes, antibiotic resistance and integrons in *Escherichia coli* strains isolated from synanthropic birds from Spain. **Avian Pathology**, v. 43, n. 2, p. 172–175, 2014.

SAIDENBERG, A. B.; KNÖBL, T. Colibacilose em aves ornamentais e silvestres: revisão. **Revista Brasileira de Ciência nos Trópicos**, v. 8, n. 1-3, p. 16-28, 2005.

SAIDENBERG, A. B. S.; GUEDES N. M. R.; SEIXAS, G. H. F.; ALLGAYER, M. C.; ASSIS, E. P.; SILVEIRA, L. F.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. A survey for *Escherichia coli* virulence factors in asymptomatic free-ranging parrots. **Vet Sci**. v.12, p.1-6. 2012.

SAIDENBERG, A. B. S.; GUEDES, N. M. R.; SEIXAS, G. H. F.; ALLGAYER, M. C.; ASSIS, E. P.; SILVEIRA, L. F.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. A survey for *Escherichia coli* virulence factors in asymptomatic free-ranging parrots. **IRSN Vet Sci**. v. 12, p.1-6, 2012a.

WAGNER, S.; GALLY, D. L.; ARGYLE, S. A. Multidrug-resistant *Escherichia coli* from canine urinary tract infections tend to have commensal phylotypes, lower prevalence of virulence determinants and ampC-replicons **Veterinary Microbiology** v. 169, p. 171-178, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

SAYAH, R. S.; KANEENE, J. B.; JOHNSON, Y.; MILLER, R. 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. **Applied And Environmental Microbiology**, Mar. 2005, p. 1394–1404

SASAKAWA, C. A. New paradigm of bacteria-gut interplay brought through the study of Shigella. Proceedings of the Japan Academy. Series B, **Physical and Biological Sciences**, v. 86, p. 229–243, March 2010. ISSN 3.

SENERWA, D.; OLSVIK, O.; MUTANDA, L. N.; LINDQVIST, K. J.; GATHUMA, J. M.; FOS-SUM, K.; WACHSMUTH, K. Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotype O111:HNT Isolated from Preterm Neonates in Nairobi, Kenya. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 27, n. 6, p.1307-1311, 1989.

SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALL'AGNOL, M.; PHILLIPS, A. D.; NATARO, J. P. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 983-997, 2001.

SHERLOCK, O.; SCHEMBRI, M.A.; REISNER, A.; KLEMM, P. Novel Roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 8058–8065, 2004.

SHERLOCK, O.; VEJBORG, R. M.; KLEMM, P. The TibA Adhesin/Invasin from Enterotoxigenic *Escherichia coli* is self-recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1954-1963, 2005.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Ed. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, Brasil. p. 912, 1997.

SILVA, C. H. P. M.; NEUFELD, P. M. Enterobactérias. In:_____. **Bacteriologia e micologia**. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 2006. p. 246-254.

SILVA, J. A.; SILVA, W. D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, n. 3, p. 175-196, set-dez. 2005.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; VLAHOVIC, M. S. A modified micro-titer-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.

STROHL, W. A.; ROUSE, H.; FISHER, B. D. **Microbiologia Ilustrada**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed 531p, 2004.

SUSSMANN, M. *Escherichia coli* and human disease. In: SUSSMAN, M. ***Escherichia coli mechanisms of virulence***. Cambridge, Reino Unido: University Press, 1997. p. 3-48.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infec. Dis.**, n. 8, p. 508-513, 2002.

TRABULSI L.R.; ALTERTHUM F. 2008. **Microbiologia**. 5 ed., São Paulo: Atheneu 760p.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N. K.; FUSSING, V.; GREEN, J.; FEIL, E.; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE, S.; STRUELENS, M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 3, p. 1-46, 2007.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 406-14, 2009.

WALKER, C. L. F.; RUDAN, IGOR. ; LIU, L. ; NAIR, H. ; THEODORATOU, E. ; BHUTTA, Z. A. ; O'BRIEN, K. L. ; CAMPBELL, H. ; BLACK, R. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **Lancet**, v. 381, p. 1405-16, Apr 2013. ISSN 9875.

WALLACE J.S.; CHEASTY, T.; ROWE B. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds, **J. Appl. Micro- boil**, v. 82, p. 399-404, 1997.

WHO. World Health Organization. Water, sanitation and hygiene links to health. 2004. Disponível em : http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/facts2004/en/index.html. Acesso em 20 jan 2015.

XENOULIS, P. G.; GRAY, P. L.; BRIGHTSMITH, D.; PALCULICT, B.; HOPPE, S.; STEINER, J. M.; TIZARD, I.; SUCHODOLSKI, J. S. Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. **Vet. Microbiol**, v. 146, p. 320-25, 2010.

YU, J.; KAPER, J. B. Cloning and characterization of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Mol. Microbiol**. v. 6, n. 3, p. 411-7, 1992.

4 CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES HÍBRIDAS DE STEC E EPEC TÍPICA ISOLADAS DE PSITACÍDEOS DE PEQUENO PORTE CRIADOS COMO “PET”

4.1 INTRODUÇÃO

As doenças causadas por agentes entéricos em psitacídeos jovens, são normalmente multifatoriais. A microbiota dessas aves é composta exclusivamente por bactérias Gram positivas e qualquer alteração tem sido relacionada à falha de manejo nutricional e sanitário (XENOULIS et al., 2010). *E. coli* é um dos agentes mais envolvidos no desequilíbrio dessa microbiota e é possível que a sua colonização em psitacídeos, seja dependente não só da espécie e estado sanitário das aves, mas que possa sofrer influência das condições do cativeiro (MATTES et al., 2005).

Escherichia coli foi considerada um micro-organismo comensal por mais de 50 anos. No entanto, vários patotipos diarreiogênicos têm sido isolados em muitos surtos em humanos e animais, devido à contaminação da água e ambiente (CHANDRAN; MAZUMDER, 2014).

As categorias que causam infecção intestinal são conhecidas como *E. coli* diarreiogênica (DEC- *Diarreiogetic Escherichia coli*). Estas foram inicialmente identificadas por meio de sorogrupos e sorotipos específicos associados aos quadros diarreicos em estudos epidemiológicos. Posteriormente, foram descritos marcadores de virulências que permitiram a classificação em patotipos: EPEC, EHEC, STEC, EaggEC, ETEC, EIEC e DAEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Esta classificação didática é de grande auxílio para a compreensão dos mecanismos implicados na ocorrência dos quadros diarreicos. No entanto, o avanço das técnicas laboratoriais e moleculares têm revelado que um mesmo sorogrupo pode estar presente em mais de um patotipo. Do mesmo modo, determinados fatores de virulência não estão restritos a uma única categoria de DEC. Elementos móveis podem disseminar genes de virulência de uma estirpe para outra, gerando grupos intermediários, com combinação de virulência ou híbridos (NYHOLM et al., 2015). Um exemplo desta situação é a toxina EAST, inicialmente descrita em EAEC, mas que pode ser detectada em estirpes de ETEC (MUNIESA et al., 2012).

Escherichia coli produtora de toxinas Shiga (STEC) é um patógeno importante no mundo inteiro, associado a doenças humanas, principalmente diarreia, colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (FRIESEMA et al., 2014). Recentemente foram identificados estirpes de STEC híbridas, pertencentes ao sorogrupo O104:H4, produtor de toxina Stx2a capaz de formar biofilme “*in vivo*” devido a presença de genes de virulência característicos de EAEC (MUNIESA et al., 2012).

Leonard et al. (2016) descreveram isolados híbridos de STEC e ETEC, com a presença do plasmídeo p7v. O sequenciamento identificou os genes que codificam a fímbria K88 e as toxinas Sta, Stb, Stx1c, Stx2g e Stx2e. Os autores concluíram que a presença de elementos móveis pode contribuir para a emergência de estirpes híbridas de STEC, com aumento do potencial de virulência.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar estirpes híbridas de STEC e EPEC típica, isoladas de psitacídeos de pequeno porte criados como “pet”.

4.2 MATERIAL E METODOS

4.2.1 Amostra bacteriana

Neste estudo foram avaliados oito estirpes de *E. coli* previamente caracterizadas *stx2*, *eae* e *bfpA*, sorogrupo O137:HNM, isoladas de psitacídeos domiciliados na cidade de São Paulo, sendo aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo e autorizados para fins científicos (CEUA 7423290414/2016).

4.2.2 Subtipagem da toxina Shiga 2

Os sete subtipos de Shiga toxina-2 foram determinados segundo a metodologia descrita por Scheutz et al. (2012). A PCR foi realizada em um volume total de 20µL, contendo 2.5 µL de água, 10 µL de HotStar Taq Master Mix (Quiagen), 1,25 µL de cada par de *primers* (5µM na solução de estoque) e 5 µL de DNA. (Quadro 6). A reação foi submetida à desnaturação a 95°C por 15 min seguidos por 35 ciclos de 50s. a 94°C, 40s. a 64°C, 60s. a 72°C, e 3 min a 72°C.

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA), em que 10 µL produto foram corados com 0,7µl de BlueGreen® (LGC Biotecnologia). Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de foto documentação ImageMaster® (AmershamBiosciences).

Quadro 6 – Sequência de *primers* utilizados para subtipagem dos genes que codificam a toxina STX-2

Gene	Sequência (5'-3')	Produto (pb)
stx2a	GCGATACTGRGBACTGTGGCC GCCACCTTCACTGTGAATGTG	347
stx2b	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC CAGCAAATCCTGAACCTGACG	251
stx2c	GAAAGTCACAGTTTTATATACAACGGGTA CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA	177
stx2d	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG TTYCCGGCCACTTTTACTGTG	179
stx2e	CGGAGTATCGGGGAGAGGC CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT	411
stx2f	TGGGCGTCATTCACTGGTTG TAATGGCCGCCCTGTCTCC	424
stx2g	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC GATGGCAATTCAGAATAACCGCT	573

Fonte: Scheutz et al., 2012.

4.2.3 Amplificação e sequenciamento dos genes *perA*, *perB*, *perC*, *bfpA*, *bfpB*, *bfpDF*, *bfpIL* e DEL

Os genes *perA*, *perB*, *perC*, *bfpA*, *bfpB*, *bfpDF*, *bfpIL* e DEL, foram amplificados por PCR. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Estados Unidos), empregando-se 2 µL do DNA da estirpe CA14, 20 pmoles de cada iniciador (*eae*, *bfpA* e *stx* –Tabela 1), e os seguintes reagentes da Invitrogen, Estados Unidos: 2 mM de MgCl₂, 200 nM de dNTPs, 1 U de *Platinum Taq DNA Polymerase*, tampão Tris-HCL (pH8,3) 1X e água ultrapura estéril em um volume final de 50 µL. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1%), visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e purificado com o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Reino Unido), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os fragmentos purificados foram sequenciados empregando-se os oligonucleotídeos iniciadores *eae*, *bfpA* e *stx*. As amostras foram preparadas conforme descrito em: <http://www.genoma.ib.usp.br/servicos/sequenciamento/produto-de-pcr->

[qualidade-e-quantificacao](#)). A reação de sequenciamento foi realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH-IB/USP). As sequências obtidas foram analisadas empregando-se as ferramentas de bioinformática BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

4.2.4 Sequenciamento de fragmentos internos de genes *housekeeping* - *Multi-locus Sequence Typing* (MLST)

A técnica do MLST envolveu a amplificação e o sequenciamento dos sete genes *house-keeping*, segundo protocolo descrito por Wirth et al. (2006). Foram utilizados fragmentos internos dos seguintes sete genes: ADK (cinase de adenilato); *fumC* (hidratase fumarato); *gyrB* (DNA girase); CID (isocitrato / isopropilmalato desidrogenase); *mdh* (malato desidrogenase); *purA* (desidrogenase adenilosuccinato) e *recA* (ATP / GTP motivo de ligação) (Quadro 7).

Quadro 7 – Os pares de iniciadores para a amplificação por PCR de fragmentos internos destes genes foram escolhidos a partir de:

Gene	Sequência 5'- 3'	Comp do Produto	Temperatura de anelamento
<i>adkF</i> <i>adkR</i>	ATTCTGCTTGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTTCGCGTATTT	583 bp	54°C
<i>fumCR1</i> <i>fumCF</i>	TCCCGGCAGATAAGCTGTGG TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806 bp	54°C
<i>gyrBF</i> <i>gyrBR1</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC GTCCATGTAGGCGTTCAGGG	911 bp	60°C
<i>icdF</i> <i>icdR</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	878 bp	54°C
<i>mdhF</i> <i>mdhR</i>	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT	932 bp	60°C
<i>purAF1</i> <i>purAF</i>	TCGGTAACGGTGTTGTGCTG CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816 bp	54°C
<i>recAR1</i> <i>recAF</i>	AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG CGCATTGCTTTACCCTGACC	780 bp	58°C

A reação de PCR foi realizada em duplicata com 50 ng de DNA bacteriano, 20 pmoles de cada iniciador *primer*, 200 pmol (10 uL de uma solução 2 mM) dos dNTPs, 10 uL de tampão de PCR 10x, 5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Fermontas Inc, Maryland/USA) e água até o volume final de 100 uL.

Condições para o PCR: a amplificação foi realizada a 95°C por 2 minutos seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a temperatura de anelamento e 2 minutos a 72°C, com a extensão a 72°C por 5 minutos.

A detecção dos produtos de amplificação (50 µL produto e 50 µL de tampão de corrida 6X) foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TAE (0,04M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA) e os fragmentos amplificados foram visualizados em um sistema de fotodocumentação, após serem corados com BlueGreen® (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New England Bio Labs Inc., Ipswich, MA/USA).

4.2.5 Determinação de alfa hemolisina

A pesquisa de hemolisinas foi realizada de acordo com Beutin et al. (1989). As estirpes foram cultivadas em tubos contendo 3 mL de caldo TSB –*Tryptic Soy Broth* (Difco—BBL, Detroit, MI, USA) (ANEXO H) e incubadas a 37°C durante 18h. Dois µL de cada inoculo foi semeado em placas de ágar de sangue contendo 5% de eritrócitos de carneiro desfibrinado e suplementado com cloreto de cálcio (CaCl₂) 10 mM. As placas foram lavadas por três vezes com PBS (pH 7,4) (ANEXO I) e incubadas a 37°C. Os resultados foram determinados por inspeção visual das zonas de lise em torno das áreas de crescimento bacteriano após 3, 18, 24 e 48 horas de incubação (BEUTIN et al., 1989). Uma cepa hemolítica de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) sorogrupo O6 foi utilizado como controle positivo.

4.2.6 Cultura celular e ensaio de aderência *in vitro* em células HeLa

Células HeLa, derivadas de adenoma de colo de útero (ATCC. CCL-2), foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 25 cm². As células foram cultivadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, EUA), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, EUA) e 1% de mistura de antibióticos (gentamicina 50 µg/mL, anfotericina B 2 µg/mL) e distribuídas em microplacas plásticas de 24 poços.

Após a formação de camada subconfluente (80%), o meio foi descartado e as placas de 24 orifícios com lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X (pH 7,4) esterilizado e em cada orifício foi adicionado 960 µL de DMEM (sem antibiótico) acrescido de 2% de SFB e 1% de D-manose (ANEXO J).

Para a realização dos ensaios de adesão, a técnica utilizada foi a mesma descrita por Cravioto et al. (1979) com algumas modificações de Martins et al. (2015). As amostras bacterianas foram inoculadas em 3 mL de caldo trípico de soja (TSB; Difco) e incubadas a 37°C por 18h sem agitação. Uma alíquota de 40 µL da cultura bacteriana foi adicionada a cada orifício e as placas foram incubadas por 3h a 37°C e, após este período, lavadas cinco vezes com PBS estéril, acrescidas de 1 mL de DMEM sem antibiótico (2% SFB e 1% de D-manose) e incubadas por mais 3h a 37°C. Ao fim do período total de 6h, as placas foram lavadas cinco vezes com 1 mL de PBS estéril por orifício para retirada das bactérias não aderidas.

As preparações nas lamínulas do teste de adesão foram fixadas com metanol absoluto por 30 min e, em seguida, lavadas três vezes com água destilada, coradas com May-Grünwald (Merck) por 5 min. Na sequência, o corante foi retirado e foi adicionado solução corante de Giemsa (Merck) e por 20 min, diluídos 1:2 e 1:3 em PBS, respectivamente. Após esse período, as preparações foram lavadas com água destilada, para retirar o excesso de corante, e secas ao ar. As lamínulas foram fixadas sobre lâminas e observadas em microscópio óptico, em aumento de 1.000 vezes. Para o controle do teste, foi utilizada uma cepa de tEPEC aderente e invasora (E2348/69) e uma cepa aderente e não invasora (JPN15) e células HeLa não infectadas.

Para o ensaio de aderência (3 e 6h) *in vitro* em células HeLa, os padrões foram classificados da seguinte forma: Aderência Localizada (AL), quando as bacté-

rias aderem à superfície celular como aglomerados apertados/compactos; Adesão Localizada-Like (ALL), quando as bactérias aderem à superfície celular, formando agregados *clusters* soltos, frouxos; Aderência Agregativa (AA), quando as bactérias aderem à superfície celular em um padrão de tijolo empilhado; Aderência Difusa (AD), quando as bactérias aderem difusamente à superfície celular, Padrão Indefinido (IND) e Padrão não Aderente (NA) (ABE et al., 2009; MORA et al., 2009).

4.2.7 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células Vero

Foi realizado o ensaio de citotoxicidade em células Vero (célula epitelial renal de macaco verde africano) de acordo com Beutin et al. (2002), com algumas modificações de Martins et al. (2015) e a extração dos sobrenadantes de acordo com Rocha e Piazza (2007). Os isolados foram cultivados em 3 mL de caldo LB a 37°C por 18h sob agitação a 180 rpm. Após esse período, foi preparado uma diluição de 1:100 em caldo EC (Merck) suplementado com ciprofloxacina 5 µg/mL (Sigma-Aldrich), e incubado por 4 horas a 37°C sob agitação a 250 rpm. Alíquotas de 1.5 mL dos cultivos foram centrifugadas a 13 000 x g por 10 min e os sobrenadantes foram coletados e armazenados a - 20°C.

Logo após, foram semeadas microplacas de 96 poços com aproximadamente 2×10^5 células Vero/mL e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% CO₂ em meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Cultilab), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina 50 µg/mL. Após incubação, o meio de cultura foi aspirado e substituído pelo meio teste (DMEM contendo 2% SFB e gentamicina 50 µg/mL). Foram adicionados os sobrenadantes ao meio de cultivo na diluição 1:10 em duplicatas os sobrenadantes e, em seguida, as placas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 72h. Os sobrenadantes de *E. coli* O157:H7 (EDL933) e K-12 (estirpes DH5α) foram utilizados como controles positivo e negativo.

Para o teste de neutralização, as células foram preparadas conforme descrito acima. Os sobrenadantes bacterianos (1:10 em DMEM) foram incubados por 2 horas a 37°C com soro policlonal de coelho anti-Stx1 e anti-Stx2 diluído 1:400. Após este período, o meio de cultivo das placas foi aspirado e substituído por aquele contendo o sobrenadante e os anticorpos, seguindo-se um período de incubação de 72 horas

a 37°C e 5% CO₂. O ensaio foi realizado em duplicatas e as células incubadas com meio contendo o soro policlonal foram utilizadas como controle.

A citotoxicidade dos isolados e a neutralização desta atividade foram quantificadas por meio da análise da atividade metabólica celular, utilizando-se o ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio; Sigma-Aldrich, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a exposição das células aos sobrenadantes, o meio foi aspirado e 30 µL da solução de MTT (Sigma- Aldrich) [1mg/mL em tampão fosfato salina (PBS)], foram adicionados e incubados a 37°C e 5% CO₂ por 4 horas. O MTT foi removido e foram adicionados 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO; Merck) e mantidos por 10 minutos sob leve agitação. A absorbância foi medida por espectrofotometria a 595 nm em leitor de ELISA Multiskan EX (Labsystems). O percentual de citotoxicidade foi determinado pela fórmula: $(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{controle negativo}}) / (\text{Abs}_{\text{controle positivo}} - \text{Abs}_{\text{controle negativo}}) \times 100$. Um isolado foi considerado altamente citotóxico quando um isolado atingiu um percentual de 50% ou mais de morte celular quando comparado ao controle.

O percentual de neutralização foi determinado pela fórmula $1 - (A/B) \times 100$, onde A é o percentual de citotoxicidade da amostra na presença de soro anti-STX2 e B é o percentual de citotoxicidade da amostra na ausência de soro anti-STX2.

4.2.8 Teste de alça ligada em coelhos e histológico

O protocolo utilizado para o teste de acúmulo de fluido em alça ligada em coelho foi o descrito por Bergdoll (1988), com algumas modificações. Utilizou-se um coelho macho da raça New Zealand, pesando 1,7 Kg e mantido em jejum durante 24 horas antes do ensaio.

Os isolados foram repicados em caldo nutriente e incubados a 37°C por 18 horas. Uma alíquota desse cultivo foi repicada em caldo de infusão de cérebro e coração adicionado de 0,1% de glicose, e novamente incubada a 37°C por 18 horas, sob moderada agitação (200rpm). Ao término desse período, a cultura foi centrifugada a 8000rpm por 20 minutos, sob refrigeração, o sobrenadante filtrado em filtros

com poro 0,45µm. O volume de 1 mL de filtrado de 1 mL de cultura bacteriana padronizada na concentração de 1×10^6 UFC foram inoculados em segmentos de íleo.

Para a cirurgia, o animal foi sedado por via intramuscular utilizando-se Fentanil na dose de 0.2 mL/kg (0.0785 mg/mL) e para o procedimento utilizou-se anestésico dissociativo – Quetamina na dose de 22 mg/Kg (100 mg/mL) e Xilazina na dose de 2 mg/Kg (20 mg/mL) por via intramuscular e por fim, para manutenção da analgesia, foram utilizados *bolus* intra venosos de Fentanil a cada 30 minutos na dose de 0.008 mg/Kg.

Realizou-se a tricotomia da região abdominal e foi feita incisão na região mediana com exteriorização do intestino. Foi realizado a lavagem do lúmen intestinal por três vezes com solução salina e feito uma série de segmentos ligados de cinco cm de comprimento, separados por inter-alças de 3 cm de comprimento e posteriormente inoculado em cada alça 1 mL da solução da amostra.

Após 12h, o coelho foi eutanasiado com *overdose* de barbitúrico e a alça intestinal do delgado examinada quanto à presença de acúmulo de líquido e de muco. O teste foi considerado positivo quando houve acúmulo de líquido superior a 1 mL/cm nos segmentos inoculados com as culturas-teste, no coelho. PBS e *E. coli* K 12 foram utilizados como controles negativos do teste. Fragmentos de 0,5 mm de intestino foram fixados em formol 10% e posteriormente desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo LEICA RM2145 e corados com Giemsa. A observação dos cortes histológicos foi realizada em microscópio óptico.

4.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Fragmentos de tecido coletados das alças intestinais foram fixados em glutaldeído 2,5% (v/v) em tampão fosfato a 0,1M. Após três lavagens com solução tampão cacodilato de sódio a 0,1M (30 min. à temperatura ambiente) (ANEXO O), pós-fixação durante 1 hora com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% (v/v) em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, e mais três lavagens com a solução tampão, as preparações foram desidratadas em gradiente crescente de concentração de etanol (50%, 75%,

85%, 95% e 100% - 30 min em cada solução). Após secagem completa do material realizada pelo método de ponto crítico do gás carbônico (aparelho de ponto crítico - mod. CPD030, Leica, Alemanha), as preparações foram montadas em um suporte apropriado para o microscópio de varredura (*stubs*), receberam uma fina camada de ouro em metalizador (mod. SCD050, Leica, Alemanha), e foram observadas em MEV (modelo Quanta 250, FEI Company, Holanda), operando em 12,5 kV e distância de trabalho 7 mm, no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

4.2.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Fragmentos de tecido coletados das alças intestinais após foram fixados em glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão fosfato a 0,1M. Após três lavagens com solução tampão cacodilato de sódio a 0,1M (30 min à temperatura ambiente), pós-fixação durante 1h com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% (v/v) em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, e mais três lavagens com a solução tampão, as preparações foram desidratadas em gradiente crescente de concentração de etanol (50%, 75%, 85%, 95% e 100% - 30 min. em cada solução) e óxido de propileno 100% (2x 30 min.).

Após este tratamento, as preparações foram infiltradas em concentrações crescentes de resina Araldite (1:2 em óxido de propileno por 4 horas e 1:1 por 16-18 horas) e finalmente emblocadas em resina 100% em moldes de silicone. As preparações foram mantidas a 60°C, durante 24-48 horas, para polimerização. Cortes ultra-finos foram depositados sobre telas de cobre para microscopia eletrônica, previamente recobertas por uma película de Formvar, e as preparações submetidas à contrastação eletrônica com acetato de uranila aquosa a 2% e citrato de chumbo. Após este procedimento, as preparações foram analisadas em MET (mod. Tecnai G2, FEI Company, Holanda), operando a 60 kV.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Subtipagem da toxina Shiga 2

Oito estirpes (CA12, CA14, CA35, PA8g, PA 24, PA56L+, PA56L-, PA58) patogênicas: *eae*⁺, *bfpA*⁺, *Stx2*⁺ foram selecionadas e submetidas a subtipagem da toxina shiga2, com resultado positivo para o gene *stx2f* em todas as amostras.

4.3.2 Amplificação e sequenciamento dos genes *perA*, *perB*, *perC*, *bfpA*, *bfpB*, *bfpDF*, *bfpIL* e DEL

Para a pesquisa dos genes de virulência (PCR) presentes no operon BFP, foram realizadas a amplificação e sequenciamento dos seguintes genes: *perA*, *perB*, *perC*, *bfpA*, *bfpB*, *bfpDF*, *bfpIL* e DEL. Todas as amostras foram positivas para os genes *perA*, *perB*, *perC*, *bfpA*. Quatro amostras foram positivas para *bfpB* e *bfpDF*; e cinco amostras positivas para *bfpIL*. DEL não foi conclusivo em todas as amostras. Os resultados encontram-se listados no Quadro 8

Quadro 8 – Genes do operon BFP das estirpes de *E. coli*

Estirpes		Genes de virulência (PCR)							
		Operon BFP							
		<i>perA</i>	<i>perB</i>	<i>perC</i>	<i>bfpA</i>	<i>bfpB</i>	<i>bfpDF</i>	<i>bfpIL</i>	DEL
CA12		+	+	+	+	+	+	+	NC
CA14		+	+	+	+	+	+	+	NC
CA35		+	+	+	+	+	+	+	NC
PA8g		+	+	+	+	+	+	+	NC
PA24		+	+	+	+	-	-	+	NC
PA56 ⁺		+	+	+	+	-	-	-	NC
PA56 ⁻		+	+	+	+	-	-	-	NC
PA58		+	+	+	+	-	-	-	NC
		Controles positivos			Controles negativos				
BFP (operon)		E2348/69			JPN15				
BFP (DEL)		aEPEC 0119			E2348/69 (não tem deleção) Possui operon completo				

NC: não conclusivo

4.3.3 Sequenciamento de fragmentos internos de genes *housekeeping* - *Multi-locus Sequence Typing* (MLST) e determinação de alfa hemolisina

Os resultados do sequenciamento de fragmentos internos de genes *housekeeping* - *Multi-locus Sequence Typing* (MLST) revelaram que as oito estirpes pertenciam ao ST 3072. Neste estudo, nenhuma das estirpes apresentou atividade hemolítica.

4.3.4 Cultura celular e ensaio de aderência *in vitro* em células HeLa

Os resultados do ensaio de aderência em 3h foram: 4/8 (50%) – Padrão indefinido (IND) e 4/8 (50%) – Padrão não aderente (NA). Em 6h: 6/8 (75%) – Aderência difusa (AD); 1/8 (12,5%) – Aderência difusa e Adesão Localizada-Like (AD/ALL); e 1/8 (12,5%) – Aderência agregativa (AA), conforme ilustra o Quadro 9 e a Figura 1.

Quadro 9 – Resultados do ensaio de aderência em 3 e 6h, representando os diferentes padrões de aderência exibidos por estirpes STEC/EPEC em células HeLa

Estirpe	Tempo de ensaio	Descrição da lâmina	Padrão
CA12	3h	Pouco aderente	IND
CA14	3h	Não aderente	NA
CA35	3h	Pouco aderente	IND
PA8g	3h	Não aderente	NA
PA24	3h	Não aderente	NA
PA56L+	3h	Não aderente	NA
PA56L-	3h	Pouco aderente	IND
PA58	3h	Muito aderente	IND
CA12	6h	Adesão moderada	AD
CA14	6h	Pouco aderente	AD
CA35	6h	Pouco aderente	AD
PA8g	6h	Adesão moderada	AD
PA24	6h	Pouco aderente	AD
PA56L+	6h	Adesão moderada com alguns clusters	AD/ALL
PA56L-	6h	Adesão moderada	AD
PA58	6h	Muito aderente	AA
Controles positivos		Controles negativos	
E2348/69		JPN15	

Figura 1 – Microscopia ótica representando os diferentes padrões de aderência exibidos por estirpes STEC/EPEC em células HeLa (a) e (c) –IND; (b) e (d) – AD; (e) – NA; (f) – AM

Controle positivo – E2348/69 1000X

Controle positivo – E2348/69 400X

a) CA12 -1000X 3h (indefinido – IND)

b) CA12 -1000X 6h (aderência difusa – AD)

c) CA35 -1000X 3h (indefinido – IND)

d) CA35 -1000X 6h (aderência difusa – AD)

e) PA08 -1000X 3h (não aderente – NA)

f)PA08 -1000X 6h (aderência difusa – AD)

4.3.5 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células Vero

Os sobrenadantes das culturas de oito isolados produziram efeito citotóxico em células Vero. Por meio do ensaio MTT foi possível a quantificação da citotoxicidade, visto que os sobrenadantes das oito STEC/EPEC mataram mais de 50% das células, quando comparadas ao controle, sendo considerados portanto, altamente citotóxico. Os resultados do ensaio de citotoxicidade demonstraram uma alta percentagem de citotoxicidade média sem anticorpo, variando de 55,80 a 88,8%, enquanto na presença de anti-Stx1 variou de 23,52 a 93,35% e de anti Stx2 variou de 0 a 95,45% como relacionados no Gráfico 2 e na Tabela 3. Para a confirmação de que o efeito citotóxico observado era devido a expressão de Stx1 e Stx2, foi realizado o teste de neutralização com anticorpos policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2. A percentagem de neutralização média variou de 0% (2/8) a 67,67% (6/8) para anti-Stx1 e para anti-Stx2 variou de 0% (2/8) a > 72% (5/8) e 100% (1/8).

Gráfico 2 – Citotoxicidade das estirpes STEC/EPEC e atividade neutralizante de anticorpos policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2. A morte de 50% ou mais das células (abaixo da linha pontilhada) foi considerada como indicativo de alta citotoxicidade

Tabela 3 – Citotoxicidade das estirpes de STEC/EPEC e atividade neutralizante de anticorpos policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2
(continua)

Ensaio de Citotoxicidade amostras <i>E.coli</i>												
Sem anticorpos												
Controles	Valores de absorbância (filtro 595nm)			Média	Desvio Padrão							
c/c	1.925	1.706	-	1.8155	0.155							
EDL (c+)	0.348	0.244	0.248	0.2800	0.059							
K-12 (c-)	0.997	1.168	1.426	1.1970	0.216							
Amostras				Média	% Citotoxicidade			Média				
CA 12	0.389	0.642	0.580	0.5370	88.11%	60.52%	67.28%	71.97%				
CA 14	0.382	0.588	0.384	0.4513	88.88%	66.41%	88.66%	81.32%				
CA 35	0.424	0.659	0.639	0.5740	84.30%	58.67%	60.85%	67.94%				
PAR 8g	0.455	0.643	0.541	0.5463	80.92%	60.41%	71.54%	70.96%				
PAR 24	0.414	0.366	0.368	0.3827	85.39%	90.62%	90.40%	88.80%				
PAR 56 L+	0.349	0.752	0.495	0.5320	92.47%	48.53%	76.55%	72.52%				
PAR 56 L-	0.726	0.678	0.652	0.6853	51.36%	56.60%	59.43%	55.80%				
PAR 58	0.635	0.593	0.554	0.5940	61.29%	65.87%	70.12%	65.76%				
Com anticorpos: Anti Stx1 (30µg)												
Amostras	Valores de absorbância (filtro 595nm)			Média	% Citotoxicidade			Média	% Neutralização			Média
CA 12	0.917	1.071	0.956	0.9813	30.53%	13.74%	26.28%	23.52%	65%	77%	61%	67.67%
CA 14	0.398	0.307	0.318	0.3410	87.13%	97.06%	95.86%	93.35%	0%	0%	0%	0.00%
CA 35	1.169	0.808	0.901	0.9593	3.05%	42.42%	32.28%	25.92%	96%	28%	47%	57.00%
PAR 8g	1.026	0.970	0.900	0.9653	18.65%	24.75%	32.39%	25.26%	74%	65%	54%	64.33%
PAR 24	0.823	0.663	0.828	0.7713	40.78%	58.23%	40.24%	46.42%	52%	36%	55%	47.67%
PAR 56 L+	0.398	0.336	0.438	0.3907	87.13%	93.89%	82.77%	87.93%	0%	0%	0%	0.00%
PAR 56 L-	0.819	0.063	0.069	0.3170	41.22%	100.00%	100.00%	80.41%	20%	0%	0%	6.67%
PAR 58	0.984	0.728	0.910	0.8740	23.23%	51.14%	31.30%	35.22%	62%	22%	55%	46.33%

(continuação)

Com anticorpos: Anti Stx2 (30µg)												
Amostras	Valores de absorbância (filtro 595nm)			Média	% Citotoxicidade			Média	% Neutralização			Média
CA 12	1.288	1.257	1.111	1.2187	0.00%	0.00%	9.38%	3.13%	100%	100%	86%	95,67%
CA 14	0.312	0.333	0.327	0.3240	97.25%	94.22%	94.87%	95.45%	0%	0%	0%	0,00%
CA 35	1.413	1.578	1.468	1.4863	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	100%	100%	100%	100,00%
PAR 8g	1.205	1.280	1.062	1.1823	0.00%	0.00%	14.72%	4.91%	100%	100%	79%	97,67%
PAR 24	0.976	1.209	0.851	1.0120	24.10%	0.00%	37.73%	20.61%	72%	100%	58%	77,00%
PAR 56 L+	0.307	0.447	0.255	0.3363	97.05%	81.79%	100.00%	92.95%	0%	0%	0%	0,00%
PAR 56 L-	1.051	1.294	0.907	1.0840	15.92%	0.00%	31.62%	15.85%	69%	100%	47%	72,00%
PAR 58	1.223	1.264	1.032	1.1730	0.00%	0.00%	17.99%	6.00%	100%	100%	74%	91,00%

4.3.6 Teste de alça ligada em coelhos, histológico, MEV e MET

A avaliação macroscópica do intestino delgado do animal submetido à necropsia apresentou em quatro amostras (4/8) acúmulo líquido menor que 1mL/cm (três com muco sanguinolento e uma com ausência de muco). Nas outras cinco amostras (5/8) houve acúmulo líquido com mais de 1 mL/cm (três sem muco, uma com pouco muco e outra com muco sanguinolento). A Tabela 4 e a Figura 2 demonstram os resultados do controle positivo e do negativo.

Tabela 4 – Avaliação macroscópica de alça intestinal do delgado quanto à presença de acúmulo de líquido e muco

Amostras	Macro	Macro
	Presença de líquido	Conteúdo
CA12	acúmulo de líquido < 1 mL/cm	Muco sanguinolento
CA14	acúmulo de líquido < 1 mL/cm	Muco sanguinolento
CA35	acúmulo de líquido < 1 mL/cm	Muco sanguinolento
PA8g	acúmulo de líquido > 1 mL/cm	Ausência de muco
PA24	acúmulo de líquido > 1 mL/cm	Pouco muco
PA56 ⁺	acúmulo de líquido > 1 mL/cm	Ausência de muco
PA56 ⁻	acúmulo de líquido > 1 mL/cm	Ausência de muco
PA58	acúmulo de líquido > 1 mL/cm	Muco sanguinolento
Controles positivos		Controles negativos
O55:H7		DH10-B

Figura 2 – (A) Intestino delgado com segmentos ligados de 5 cm de comprimento, separados por inter-alças de 3 cm de comprimento. Posteriormente inoculado em cada alça 1 mL da solução de amostra. A fotografia do painel A, demonstra aumento de fluido > 1 mL. No painel (B), excisão de uma alça infectada com bactéria, revelando secreção de natureza mucoide. As fotografias são representativas de uma amostra (CA12)

As alterações histopatológicas, por meio da microscopia ótica, estão relacionadas no Quadro 10. A avaliação por meio da microscopia de varredura e transmissão são representativas referentes ao controle positivo (C+), controle negativo (C-) e amostras CA12, CA14, CA35 e PA08 conforme as Figuras 3, 4 e 5.

Quadro 10 – Descrição histopatológica de fragmentos de alça intestinal do delgado corados por Giemsa e visualizados em microscopia ótica em aumento de 10X e 40X

Descrição histopatológica	Fragmento de amostras							
	CA 12	CA 14	CA 35	PA 08	PA 24	PA 56 ⁺	PA 56 ⁻	PA 58
Aderência de bactérias aos enterócitos	+/-	+	+/-	-	-	+	-	+
Âpices em apoptose e descamando	+	+	+	+	+	-	-	-
Ausência de heterófilos	-	-	-	+	-	-	-	-
Células caliciformes evidentes	+	+	+	-	-	-	-	+/-
Criptas preservadas	-	-	-	+	-	-	-	+
Dilatação de linfáticos da lâmina própria (LP)	+	+	-	+	+	-	-	+
Dilatação de linfáticos de submucosa	+	-	-	-	+	-	-	+
Enterite aguda difusa	-	+	-	-	+	+	-	-
Enterócitos com bactérias aderidas no lúmen	-	+/-	-	-	+	-	-	+
Enterócitos descamados e muco	+	-	-	-	-	-	-	-
Hemorragia difusa lâmina própria (LP)	-	-	-	-	+	-	+	-
Heterófilos na lâmina própria	-	+	+/-	-	+	+	-	+/-
Heterófilos na submucosa	+/-	+	+	+	+	+	-	+/-
Infarto de mucosa	-	-	-	-	-	-	+	-
Linfócitos intra epiteliais (LIE)	-	-	-	-	-	-	10	20
Muco, hemácias e bactérias cocóides	+	+	-	-	+	-	-	+
Necrose de vilosidades	-	-	-	-	-	+	+	-
Relação vilosidade/crípta (V/C) preservada	-	-	-	6/1	3/1	-	-	5/1
Vilosidades em formato de lança	+	+	-	+	-	-	-	-

+ – muito; +/- – intermediário; - ausente

Figura – 3 Intestino delgado de coelho: (A) e (B) Controle positivo (C+): O55:H7 – visualizados em microscopia ótica em aumento de 10X e 40X respectivamente, corados por Giemsa. (C) Microscopia de varredura e (D) Microscopia de transmissão

Figura – 4 Intestino delgado de coelho: (A) e (B) Controle negativo (C-): DH10-B – visualizados em microscopia ótica em aumento de 10X e 40X respectivamente, corados por Giemsa. (C) Microscopia de varredura e (D) Microscopia de transmissão

Vilosidade com o ápice em descamação, relação V/C está em 5/1; dilatação de linfáticos na submucosa onde há poucos heterófilos e discretos focos de hemorragia. Nas vilosidade dilatação dentro do normal (< 10% dos da LP da vilosidade); número médio de linfócito intra-epitelial (LIE) = 11. Criptas sem alteração; células caliciformes normais.

Figura – 5 Intestino delgado de coelho: (A e B) amostra CA12 – visualizados em microscopia ótica em aumento de 10X, corados por Giemsa. (B) Microscopia de varredura e (C) Microscopia de transmissão

Vilosidades em formato de lança, com ápice de algumas com enterócitos descaamados e muco. No lúmen verificam-se focos de células descaamadas, muco, hemácias e bactérias cocóides aderidas. Dilatação de linfáticos da LP (corresponde a 50% da LP e em todas as vilosidades) e submucosa. Poucos focos de aderência de bactérias aos enterócitos. Células caliciformes evidentes LIE em média 37. Relação V/C 6/1 raros heterófilos na submucosa. Ausência de heterófilos na LP.

Barras MEV – 5µm

Barras MET – 1µm

Presença de muco. Enterócitos se soltando do fragmento. Presença de bactérias aderidas ao tecido (seta). As microvilosidades estão alteradas e as bactérias meio “enterradas”.

4.4 DISCUSSÃO

As zoonoses e as doenças transmissíveis continuam a registrar taxas de incidência elevadas, causando morbidade e mortalidade significativas em todos os países, principalmente nos em desenvolvimento. É importante identificar os agentes etiológicos e o risco que eles representam para aves de cativeiro (GIOIA-DI CHIACCHIO et al., 2016), pois a criação desses animais reúne condições que favorecem a disseminação dessas zoonoses. Segundo GOMES (2002) as enfermidades infecciosas representam mais da metade das causas de óbito entre as aves e, cerca de 70% das enfermidades de etiologia bacteriana são causadas por membros da família Enterobacteriaceae.

Neste estudo, oito estirpes híbridas de STEC/tEPEC (*eae*⁺, *bfpA*⁺, *stx2*⁺), foram submetidas a subtipagem do gene que codifica da toxina Shiga2, com resultado positivo para o gene *stx2f* em todos os isolados. Segundo Friesema et al. (2014) a variante *Stx2f* tem sido raramente associada a infecções humanas sintomáticas. Porém, os autores afirmam que as infecções causadas por STEC *Stx2f* nos Países Baixos são mais frequentes do que o esperado. Segundo Murakami et al. (2014) os casos de infecção humana STEC *Stx2f* estão se tornando mais frequentes e os pombos são considerados possíveis fontes de infecção desta zoonose.

Na Europa, estirpes de STEC *Stx2f* que acometem pombos e humanos têm sido alvo de investigação epidemiológica. Os estudos revelaram a presença de STEC *Stx2f* pertencentes aos sorotipos O15, O18ab:HNM, O25:H7, O45:HNM, O66:HNM, O75:HNM, O128:H2, O132, O135: HNM, O152:HNM e O- sorotipos não tipáveis em pombos japoneses e europeus (MURAKAMI et al., 2014). Em nosso estudo, todas as amostras pertenciam ao sorogrupo O137:HNM. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) o sorotipo O137:H41 foi relatado como agente da Síndrome urêmica hemolítica (HUS) em humanos (OMS, 1998). Estirpes O137:HNM foram detectadas em bovinos no estado do Rio Grande do Sul (TIMM et al., 2007), mas não há evidências da presença deste sorotipo em aves.

É interessante ressaltar que o *stx2f* está presente em estirpes de *E. coli* de pombos pertencentes a diferentes sorotipos, isolados em diferentes países e que essas estirpes mencionadas como não-O157 EHEC também têm sido relatadas como causa de doença em humanos (OMS, 1998; SCHMIDT et al., 2000).

O fato de isolarmos STEC Stx2f em calopsitas e periquitos australianos é fundamental para alertarmos quanto aos riscos zoonóticos, uma vez que essas aves encontram-se cada vez mais próximas de humanos e de outras aves sinantrópicas, como pombos e de aves selvagens. A importância da investigação em psitacídeos cativos reforça a necessidade de estudos que envolvam esses patótipos e seus fatores de virulência.

Nos estudos realizados por Reple et al. (2015) foram isoladas EPEC típicas, que são consideradas raras em animais, sendo este patótipo encontrado principalmente em humanos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A presença de EPEC típicas em psitacídeos sugere a transmissão de caráter antropozoonótico como mais provável (REPLE et al., 2015).

O patótipo STEC possui duas designações STEC e EHEC. A primeira refere-se a estirpes de *E. coli* produtoras da toxina de Shiga 1 e 2 (Stx1 e Stx2), denominadas pela semelhança à toxina produzida pela *Shigella dysenteriae*. A segunda corresponde ao subgrupo de sorotipos de STEC que, além de produzir essa toxina, é capaz de causar a lesão histológica *attaching and effacing* (A/E) (MELTON- CELSA, 2014). As estirpes deste estudo foram caracterizadas como STEC subtipo EHEC não-O157, pois os resultados do ensaio de alça ligada em coelho demonstraram a presença das lesões histológicas *attaching and effacing*.

Quatro estirpes desse estudo foram confirmadas quanto a hibridização *eae+*, *bfpA+*, *Stx2f* (STEC/tEPEC), por meio da pesquisa dos genes de virulência presentes no operon BFP. Este é um achado importante, pois não há relatos na literatura que confirmem esses dados, nem em humanos nem em aves assintomáticas como ocorreu em nossa pesquisa.

Muniesa et al. (2012) identificaram um híbrido de STEC/EaggEC em um surto de diarreia em humanos causado por pepinos contaminados. A epidemia alemã de *E. coli* O104:H4 foi um exemplo de combinação de genes de virulência derivados de dois patógenos distintos que, quando reunidos em um organismo, apresentaram novas manifestações clínicas de doença que surpreenderam a comunidade médica. A facilidade com que esta combinação de dois elementos móveis do DNA pode ser adquirida por *E. coli* sugere que esta não será a última “surpresa” deste patógeno versátil.

Nyholm e colaboradores (2015) realizaram pesquisas na Finlândia, com 450 estirpes de *E. coli* (STEC) isoladas de seres humanos, animais (bovinos e alces) e

ambiente. Todas foram examinadas por PCR multiplex visando os genes de virulência de vários patótipos de DEC, simultaneamente. De três estirpes STEC/ETEC isoladas em humanos, dois pacientes apresentavam síndrome hemolítica urêmica e diarreia, sendo que um era assintomático. A emergência de novos patógenos híbridos deve ser levada em conta, tanto em relação ao cuidado de pacientes quanto à vigilância epidemiológica. Os mesmos autores, também afirmaram que, *E. coli* Shigatoxigênica e outras DEC são capazes de adquirir genes de virulência por transferência horizontal de outros patótipos, levando ao desenvolvimento de patótipos denominados como intermediários, híbridos ou combinação de virulência.

Recentemente Leonard et al (2016), nos EUA, relataram que isolados híbridos de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) que codificam enterotoxina termoestável (ST) estão sendo isoladas com maior frequência. As estirpes (STEC/ETEC), que foram isoladas a partir de amostras clínicas ambientais, animais e humanas, podem representar uma ameaça emergente como agentes patogênicos de origem alimentar. A caracterização dessas estirpes é importante para avaliar o potencial de virulência, ajudar no desenvolvimento de métodos de detecção de patógenos e compreender como as linhagens híbridas evoluem para ter um maior impacto na saúde pública.

A história evolucionária dos patógenos vem sendo elucidada com dados de MLST. Maiden (2006) afirma que um patógeno ocasional que causou um surto de doença em Israel foi causada por uma variante que surgiu pela hibridização de duas variantes aquáticas. Isso é importante para análises epidemiológicas e investigativas das populações devido à capacidade técnica em identificar estirpes associadas a diferentes países, em diferentes períodos, além de identificar a cepa ancestral (selvagem) que ainda não sofreu modificações ou adaptações aos ecossistemas. Outro ponto importante é que a proposta da técnica proporciona melhor conhecimento da evolução bacteriana, discriminando estirpes de acordo com suas origens.

O resultado do sequenciamento de fragmentos internos de genes *house-keeping-Multi-locus Sequence Typing* (MLST), encontrado em nossa pesquisa, comprovou que as oito estirpes selecionadas pertencentes a sequência tipo (*sequence type* – ST) 3072. Este ST consta no banco de dados público do MLST com a descrição de uma estirpe de EPEC sorotipo O137:H6, isolada na Suíça em 2011, de paciente humano <<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi.html>>

Em relação ao teste de detecção de hemolisina, nenhuma das amostras analisadas no estudo foi positiva, estando de acordo com o trabalho realizado por (GUASTALLI et al., 2010) em amostras de aves de postura comercial, não hemolíticas.

Os resultados para citotoxicidade demonstraram percentagem alta de citotoxicidade média sem anticorpo, variando de 55,8 a 88,8%, enquanto na presença de anti Stx2 variou de 0 a 95,45%. Seis isolados foram considerados altamente citotóxicos devido a capacidade de matarem mais de 50% das células quando comparados ao controle positivo. Para a confirmação de que o efeito citotóxico era devido à expressão de Stx2, foi realizado o teste de neutralização com anticorpos policlonais anti-Stx2 e a percentagem de neutralização média variou de 0% (2/8) a > 72% (5/8) e 100% (1/8), sugerindo alta expressão de Stx nos isolados.

Algumas bactérias, como *E. coli*, que possuem a capacidade de realizar adesão íntima no mucosa intestinal do hospedeiro (adesão localizada - *localized adhesion* – LA), são capazes de causar lesões (*attaching and effacing* - A/E), *in vivo* e em certos tecidos e culturas celulares *in vitro* (LAW et al., 2013). A habilidade de produzir A/E não se restringe à EPEC, mas também em *E. coli*, produtora de Shiga toxina, STEC (LAW et al., 2013). As lesões de A/E são mais facilmente identificadas em tecidos corados com Giemsa, mas a identificação definitiva das lesões de A/E requer uma avaliação microscópica eletrônica (VIEIRA, 2009).

Para os ensaios de aderência *in vitro* em 3h em células HeLa, os resultados foram 50% indefinidos e 50% não aderente (NA) e em 6h foram: 6/8 (75%) – aderência difusa (AD); 1/8 (12,5%) – aderência difusa (AD) e Adesão Localizada-Like (AD/ALL); e 1/8 (12,5%) – aderência agregativa (AA). Dias (2015), pesquisando a prevalência de amostras de *Escherichia coli* diarreiogênica isoladas de crianças na cidade de Botucatu observou que a maioria dos isolados de EPEC obtidos das fezes de crianças saudáveis aderiram em um padrão não-determinado ou indefinido (44,4%), enquanto 11,1% não foram capazes de aderir às células epiteliais. Em nosso estudo, curiosamente, esses dois padrões de aderência também foram observados após 3h e todas as aves também estavam saudáveis.

Mais estudos são necessários para as investigação de padrões de aderência *in vitro*, uma vez que todas as estirpes deste estudo eram *eae*⁺ + *bfp*⁺ e *stx2f*, compatíveis com aderência em 3h. Para os ensaios *in vivo* em alça ligada em coelho, os

resultados apresentaram aderência e lesões confirmados na histopatologia, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

Em nosso estudo, na macroscopia pós necropsia do intestino delgado, observou-se a presença de conteúdo líquido em quantidades variáveis e muco em 5/8 sendo de aspecto sanguinolento em 4/5 amostras.

Segundo Vieira e colaboradores (2010), o muco intestinal oferece vantagens ecológicas para bactérias da microbiota, bem como para as patogênicas devido à presença de sacarídeos necessários para o crescimento dessas bactérias. A produção de muco e as células caliciformes contribuem para a proteção contra microrganismos virulentos por meio de barreiras químicas e físicas. Alguns grupos de *MUC* genes são responsáveis pela produção de mucina. Os autores reportaram o aumento da expressão gênica responsável pela produção de mucina, estudando estirpes de aEPEC. Relataram também, que o aumento da produção de mucina não é uma resposta de defesa para infecções aEPEC, mas favorece o crescimento destas bactérias na superfície celular.

No exame histopatológico do intestino delgado, com lâminas coradas pelo método de Giemsa, na maioria das lesões estudadas foram visualizados vilosidades em formato de lança, com apoptose e heterófilos no ápice além de hemácias, enterócitos descamados e bactérias cocóides misturadas ao muco no lúmen. Os vasos linfáticos estavam dilatados e alguns com hemácias e heterófilos. Na submucosa observou-se de raros a moderados heterófilos. Esses dados corroboram com os resultados apresentados por Pakpinyo et al. (2002) e Wales et al. (2005).

Wales et al., 2005 afirmam que as descrições histopatológicas de intestinos colonizados por bactérias que produzem a lesão A/E geralmente aderem enterócitos num padrão extenso ou multifocal e têm tipicamente aparência coccóide distinta. As células colonizadas mostram-se degeneradas e muitas hipercromáticas, arredondadas ou picnóticas. O desprendimento de enterócitos são comumente observados e um infiltrado inflamatório de intensidade variável, neutrofílico é frequentemente visto na lâmina própria.

Tanto na microscopia eletrônica de varredura, quanto na microscopia eletrônica de transmissão, foi possível visualizar bactérias aderidas a enterócitos, destruição de microvilosidades, formação de pedestal, confirmando, assim, a patogenicidade das estirpes de *Escherichia coli* diarreiogênicas estudadas nesta pesquisa, corrobo-

rando com várias autores (VIEIRA et al., 2010; PIAZZA et al., 2013; LEWIS et al., 2015)

Pakpinyo et al. (2002), estudaram *Escherichia coli* enteropatogênica em perus com síndrome da enterite. Os isolados EPEC foram examinados quanto à patogenicidade e capacidade de induzir lesões em perus jovens inoculados experimentalmente. Essas lesões localizadas nos intestinos, foram corados com Giemsa e identificadas por microscopia ótica. Foram visualizadas microcolônias bacterianas ligadas a superfícies epiteliais, com degeneração epitelial nos locais de fixação e infiltrado inflamatório na lâmina própria. A microscopia eletrônica confirmou a identidade de lesões de A/E. Esses achados fornecem evidências adicionais sugerindo um possível papel para EPEC na patogênese da síndrome da enterite em perus.

Seeley et al. (2014) realizaram pesquisas sobre *attaching-effacing Escherichia coli* em periquitos australianos de cativeiro. Os autores afirmam que, ao contrário do gado, os psitacídeos geralmente não são considerados reservatórios de *E. coli* enteropatogênica. Neste estudo, descreveram enterite em uma população de periquitos cativos presentes no zoológico de Massachusetts, EUA, levantando a importância dessa bactéria presente na microbiota de algumas espécies de aves e seu potencial zoonótico. Existem poucos trabalhos que avaliem a patogenicidade intestinal para STEC em aves.

A caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* diarreiogênica pode contribuir para o diagnóstico e para medidas preventivas e de controle às práticas de criação e manutenção de psitacídeos de pequeno porte.

As estirpes híbridas STEC/tEPEC encontradas neste estudo reforçam a necessidade de mais estudos, uma vez que se trata de um achado inédito tanto na literatura humana quanto na veterinária, representando uma ameaça emergente como patógeno de origem aviária além das possíveis consequências para a saúde pública.

4.5 CONCLUSÕES

- As estirpes avaliadas não são hemolíticas, mas produzem toxinas *in vitro*; aderem *in vitro* em células HeLa e causam lesões A/E em modelo de alça intestinal de coelho;
- As estirpes induziram processo inflamatório e aumento de muco intestinal quando inoculadas em coelhos;
- Os dados deste trabalho revelaram o potencial zoonótico dos híbridos STEC/tEPEC sorogrupo O137:HNM; ST 3072 isolados de psitacídeos de pequeno porte criados como “pet”.

REFERENCIAS

- ABE, C. M.; TRABULSI, L. R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; Blanco, J.E.; Mora, A.; Franzolin, M. R.; Taddei, C. R.; Martinez, M. B.; Piazza, R. M. F.; Elias, W. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae+ EAF-negative stx-genetic profile. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, p. 357–365, 2009.
- BERGDOLL, M. S. Ileal Loop Fluid Accumulation Test for Diarrheal Toxins. **Meth Enzim**, v.165, p. 306-23, 1988.
- BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M. A.; ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R. Close association of Verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2559-2564, 1989.
- CHANDRAN, A.; MAZUMDER, B. Occurrence of diarrheagenic virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various avian hosts in British Columbia, Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1933–40, 2014.
- FRIESEMA, I.; VAN DER ZWALUW, K.; SCHUURMAN, T.; KOOISTRA-SMID, M.; FRANZ, E.; VAN DUYNHOVEN, Y.; VAN PELT, W. Emergence of *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f in human Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) infections in the Netherlands, January 2008 to December 2011. **Euro Surveill**, v.19, n. 17, 2014.
- GIOIA-DI CHIACCHIO, R. M.; CUNHA, M. P. V.; STURN, R. M.; MORENO, L. Z.; MORENO, A. M.; PEREIRA, C. B. P.; PIAZZA, R.M.F.; KNÖBL, T. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC): Zoonotic risks associated with psittacine pet birds in home environments. **Veterinary Microbiology**, v. 184, p. 27-30, 2016.
- GOMES, M.S. **Implantação de medidas profiláticas no Zoológico do Município de São Bernardo do Campo: uma análise de custo e benefício**. 2002. 97f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- GUASTALLI, E. A. L.; GAMA, N. M. S. Q.; BUIM, M. R.; OLIVEIRA, R. A.; FERREIRA, A. J. P.; LEITE, D. S. Índice de patogenicidade, produção de hemolisina e sorogrupo de amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves de postura comercial. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 153-157, 2010.
- KAPER J. B.; NATARO J. P.; MOBLEY H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**., v. 2, p. 123–140, 2004.
- LAW, R. J.; GURARIE, L.; ROSENSHINE, I.; FINLAY, B. B. *In vitro* and *in vivo* model systems for studying enteropathogenic *Escherichia coli* infections. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2013.

LEONARD, S. R.; MAMMEL, A. M. K.; RASKO, D. A.; LACHER, D. W. hybrid Shiga toxin-producing and enterotoxigenic *Escherichia* sp. cryptic lineage 1 strain 7v harbors a hybrid plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 14, July 2016.

LEWIS, S. B.; COOK, V.; TIGHE, R.; SCHÜLLER, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* colonization of human colonic epithelium *in vitro* and *ex vivo*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, 2015.

MAIDEN, M. C. J. Multilocus Sequence Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 561-588, 2006.

MARTINS, F. H.; GUTH, B. E. C.; PIAZZA, R. M.; LEÃO, S. C.; LUDOVICO, A.; LUDOVICO, M. S.; DAHBI, G.; MARZOA, J.; MORA, A.; BLANCO, J.; PELAYO, J. S. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, southern Brazil. **Veterinary Microbiology** 175 150–156. 2015.

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. **Arq Inst Biol**, v. 72, n. 1, p. 13-6, 2005.

MELTON-CELSA, A. R. 2014. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. **Microbiol Spectrum**, v. 2, n. 3: EHEC-0024-2013.

MORA, A.; BLANCO, M.; YAMAMOTO, D.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E.; LÓPEZ, C.; ALONSO, M. P.; VIEIRA, M. A. M.; HERNANDES, R. T.; ABE, C. M.; PIAZZA, R. M. F.; LACHER, D. W.; ELIAS, W. P.; GOMES, T. A. T.; BLANCO, J. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different eae and tir alleles. **International Microbiology**, v. 12, p. 243-251, 2009.

MUNIESA, M.; HAMMERL, J. A.; HERTWIG, S.; APPEL, B.; BRÜSSOW, H. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4: a New Challenge for Microbiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4065–4073, 2012.

MURAKAMI, K.; ETOH, Y.; ICHIHARA, S.; MAEDA, E.; TAKENAKA, S.; HORIKAWA, K.; NARIMATSU, H.; KAWANO, K.; KAWAMURA, Y.; ITO, K. Isolation and characteristics of Shiga Toxin 2f-Producing *Escherichia coli* among pigeons in Kyushu, Japan. **PLoS ONE** v, 9, n. 1, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0086076.

NYHOLM, O.; HEINIKAINEN, S.; PELKONEN, S.; HALLANVUO, S.; HAUKKA, K.; SIITONEN, A. Hybrids of Shigatoxigenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) among human and animal isolates in Finland. **Zoonoses Public Health**, v. 62, p. 518–524, 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/zph.12177>.

PAKPINYO, S.; LEY, D. H.; BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GUY, J. S. Prevalence of Enteropathogenic *Escherichia coli* in Naturally Occurring Cases of Poultry Enteritis–Mortality Syndrome. **Avian Diseases**, v. 46, p. 360–369, 2002.

PIAZZA, R. M. F.; DELANNOY, S.; FACH, P.; SARIDAKIS, H. O.; PEDROSO, M. Z.; ROCHA, L. B.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; BEUTIN, L.; GUTH, B. E. C. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* O26:H8 among diarrheagenic *E. coli* O26 strains isolated in Brazil **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 22, p. 6847–6854, 2013.

REPLE, J. N. et al. Análise filogenética de *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC) e produtoras de toxina shiga (STEC) isoladas de fezes de psitacídeos: avaliação do potencial zoonótico. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 81-83, apr. 2015. ISSN 2179-6645. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz/article/view/25730>>. Acesso em: 17 dec. 2016.

ROCHA, L. B.; PIAZZA, R. M. Production of Shiga toxin by Shiga toxin-expressing *Escherichia coli* in broth media: from divergence to definition. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 411-417, 2007.

SAIDENBERG, A. B. S., GUEDES N. M. R., SEIXAS, G. H. F., ALLGAYER, M. C., ASSIS, E. P., SILVEIRA, L. F., MELVILLE, P. A., BENITES, N. R. A survey for *Escherichia coli* virulence factors in asymptomatic free-ranging parrots. **Vet Sci**. v. 12, p. 1-6, 2012.

SAIDENBERG, A. B. S.; GUEDES, N. M. R.; SEIXAS, G. H. F.; ALLGAYER, M. C.; ASSIS, E. P.; SILVEIRA, L. F.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. A survey for *Escherichia coli* virulence factors in asymptomatic free-ranging parrots. **IRSN Vet Sci**, v. 12, p. 1-6, 2012a.

SCHEUTZ, F.; TEEL, A. L. D.; BEUTIN, B. L.; PIÉRARD, C. D.; BUVENS, D. G.; KARCH, D. H.; MELLMANN, E. A.; CAPRIOLI, E. A.; TOZZOLI, F. R.; MORABITO, F. S.; STROCKBINE, F. N. A.; MELTON-CELSA, G. R.; SANCHEZ, B. M.; PERSSON, B. S.; O'BRIEN, A. D. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing stx nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2951–2963, 2012.

SCHMIDT, H.; SCHEEF, J.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, ALFREDO.; WIELER, L. H.; KARCH, H. A new Shiga toxin 2 variant (stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1205–1208, 2000.

SEELEY, K. E.; BAITCHMAN, E.; BARTLETT, S.; DEBROY, C.; GARNER, M. Investigation and control of an attaching and effacing *Escherichia coli* outbreak in a colony of captive budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 45, n. 4, p. 875-882, 2014.

TRABULSI L.R.; ALTERTHUM F. 2008. **Microbiologia**. 5 ed., São Paulo: Atheneu 760p.

TIMM, C. D.; IRINO, K.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. M.; GUTH, B. E. C.; VAZ, T. M. I.; MOREIRA, C. N.; ALEIXO, J. A. G. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Letters in Applied Microbiology** ISSN 0266-8254. Journal compilation a 2007 The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, São Paulo, v.33, n.4, p.406-14, 2009.

VIEIRA, M. A. M.; GOMES, T. A. T.; FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T.; SERVIN, A. L.; MOAL, V. L. Two atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains induce the production of secreted and membrane-bound mucins to benefit their own growth at the apical surface of human. Mucin-Secreting Intestinal HT29-MTX cells. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 927-938, 2010.

WALES, A. D.; WOODWARD, M. J.; PEARSON, G. R. Attaching-effacing bacteria in animals. **J. Comp. Path**, v. 132, p. 1–26, 2005.

WIRTH, T.; FALUSH, D.; LAN, R.; COLLES, F.; MENSA, P.; WIELER, L.H.; ACHTMAN, M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 5, p.1136-1151, 2006.

WHO. World Health Organization. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working group Meeting. Berlin, Germany, June 1998" Disponível em : http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68880/1/WHO_CSR_APH_98.8.pdf Acesso em 20 dez 2016.

XENOULIS, P. G.; GRAY, P. L.; BRIGHTSMITH, D.; PALCULICT, B.; HOPPES, S.; STEINER, J. M.; TIZARD, I.; SUCHODOLSKI, J. S. Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. **Vet. Microbiol**, v. 146, p. 320-25, 2010.

ANEXO A – Água Peptonada (*Buffered Peptone Water* DIFCO™)

Utilizada para cultivo de organismos não fastídios e para realização de testes indol.

Composição:

Peptonada.....	10 g
Cloreto de Sódio.....	10 g
Água destilada.....	1000 mL

Procedimento:

Misturar todos os componentes, ajustar o pH (7,2 – 7,4) e autoclavar por 15 minutos a 121°C.

ANEXO B – BHI (*Brain Heart Infusion*, BACTO™)

Um meio para cultivo de uma grande variedade de microrganismos, incluindo organismos fastídicos, leveduras e fungos.

Composição:

Cérebro de vitelo.....	7,7g
Coração de boi.....	9,8g
Protease Peptona.....	10,0g
Dextrose.....	2,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Fosfato dissodico.....	2,5g
Água destilada.....	1000mL

Procedimento:

Misturar todos os componentes, ajustar o pH ($7,4 \pm 0,2$ a 25°C), distribuir 2mL em tubos e autoclavar por 15 minutos a 121°C .

ANEXO C – MacConkey (*MacConkey DIFCO™*)

Agar MacConkey é o meio seletivo e diferencial para cultivo de microrganismos entéricos de uma variedade de espécimes clínicos.

Composição:

Peptona.....	17 g
Proteose peptona.....	03 g
Lactose.....	10 g
Cloreto de sódio.....	05 g
Ágar.....	13,5 g
Vermelho neutro.....	0,03 g
Cristal de violeta.....	1 mg
Sais biliares nº 3.....	1,5 g
Água destilada.....	1000 mL

Procedimento:

Suspender 50g da solução em 1000 mL de água destilada e misturar;

Aquecer para dissolução completa;

Manter o pH em 7,1 +/- 0,2 a 25°C e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

ANEXO D – Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) -

Meio utilizado para diferenciação de enterobactérias de acordo com: Fermentação de lactose, glicose e sacarose e Produção de sulfeto de hidrogênio e dióxido de carbono.

Composição: g/l

Peptona Especial.....	20.0
Lactose.....	10.0
Sacarose.....	10.0
Cloreto de Sódio.....	5.0
Extrato de Bife.....	3.0
Extrato de Levedura.....	3.0
Glicose.....	1.0
Sulfato Férreo.....	0.2
Tiosulfato de Sódio.....	0.3
Vermelho Fenol.....	0.025
Agar.....	12.0

pH Final = 7.3 ± 0.2 a 25°C

ANEXO E – Meio Luria-Bertani - Meio LB Líquido (100 ml) (KASVI™):

Utilizado para o cultivo e manutenção de cepas recombinantes de *Escherichia coli*, pode ser usado para o isolamento de rotina e cultivo de microorganismos particularmente não fastídicos. O meio é nutritivamente rico para o crescimento de colônias puras de cepas recombinantes de *E. coli*.

Composição:	(g/l)
Triptona.....	10,0
Extrato de Levedura.....	5,0
Cloreto de sódio - NaCl.....	10,0
Água destilada – qsp.....	1000mL
Ajustar o pH para 7,2 com NaOH 5N	

Procedimento:

Suspender 20g do pó em 1 litro de água destilada ou deionizada.

Misturar até dissolver completamente.

Dispensar em recipiente final.

Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.

ANEXO F – Agar Triptona de Soja (TSA) – KASVI™

Meio de cultivo, isolamento e manutenção de microrganismos fastidiosos (exigentes). A Adição de sangue (coelho, cavalo, carneiro) permite a visualização de zonas hemolíticas de estreptococos e outras bactérias.

Composição	g/L
Triptona.....	15,0
Digestão Papaica de Farinha de Soja.....	5,0
Cloreto de Sódio.....	5,0
Agar.....	15,0
pH Final: 7,3 + 0,2 a 25°C	

Procedimento:

Suspender 40 g de pó em 1 litro de água destilada ou deionizada.

Aquecer até ferver de forma que fique completamente dissolvido.

Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Resfriar entre 45-50°C.

Misturar bem.

Distribuir em placas de Petri.

ANEXO G – *Tryptic Soy Broth* (TSB) – (Difco – BBL, Detroit, MI, USA)

É um caldo de uso geral que suporta o crescimento de uma grande variedade de microrganismos anaeróbicos, aeróbicos facultativos e fungos.

Composição	g/l
Triptona.....	17.0
Digestão Papaica de Farinha de Soja.....	3.0
Glicose.....	2.5
Cloreto de Sódio.....	5.0
Fosfato Dipotássico.....	2.5
pH Final= 7.3 + 0.2 a 25°C	

ANEXO H – Tampão Fostato Salina - PBS

Tampão ideal para cultura de células, análise de citometria de fluxo e biologia molecular. Auxilia na manutenção de um pH constante.

Tampão Fosfato 0,2 M – Solução A (Fisher Scientific)

Composição	g/1000mL
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	27,598

Tampão Fosfato – Solução B (Fisher Scientific)

Composição	g/1000mL
NaH ₂ PO ₄ . 7H ₂ O	5.36
Ou	
NaH ₂ PO ₄ . 12H ₂ O.....	7.17
Ou	
Na ₂ HPO ₄	28,392

Solução **A** → 140 mL +

Solução **B** → 360 mL

500 mL (pH 7,4)

Tampão Fosfato Salina – PBS pH 7,4**Composição**

Solução A (0,2 M).....	140 mL
Solução B (0,2 M).....	360 mL
NaCl (Merck)	8,5 g
Água deionizada.....	500 mL

ANEXO I – SOLUÇÃO DE D-MANOSE A 2%

Composição	g/l
D-manose	2.0
H2O bidestilada q.s.p.....	100 mL

ANEXO J – Perfil de Resistencia a antimicrobianos

Grupo	Beta-lactâmicos						Sulfonamida				Fenicol				Quinolonas			
amostra	AMP	AMC	CPM	CFO	CFT	POL	SUL	SUT	FOS	TET	FLF	NEO	TOB	EST	ENO	CIP	MXF	NAL
CA04	R	18 _{mm} S	18 _{mm} S	22 _{mm} S	R	14 _{mm} S	22 _{mm} S	28 _{mm} S	22 _{mm} S	R	30 _{mm} S	18 _{mm} S	18 _{mm} S	16 _{mm} S	30 _{mm} S	28 _{mm} S	26 _{mm} S	S
CA09	R	16 _{mm} I	30 _{mm} S	18 _{mm} S	S	14 _{mm} S	R	R	34 _{mm} S	R	24 _{mm} S	20 _{mm} S	16 _{mm} S	14 _{mm} I	R	R	R	R
CA11	R	18 _{mm} S	R	26 _{mm} S	R	16 _{mm} S	R	24 _{mm} S	30 _{mm} S	R	28 _{mm} S	20 _{mm} S	20 _{mm} S	16 _{mm} S	28 _{mm} S	32 _{mm} S	26 _{mm} S	S
CA11A	R	14 _{mm} I	12 _{mm} R	24 _{mm} S	R	16 _{mm} S	R	30 _{mm} S	23 _{mm} S	R	26 _{mm} S	18 _{mm} S	20 _{mm} S	12 _{mm} I	26 _{mm} S	24 _{mm} S	24 _{mm} S	S
CA12	22 _{mm} S	24 _{mm} S	28 _{mm} S	22 _{mm} S	REP	14 _{mm} S	22 _{mm} S	R	28 _{mm} S	26 _{mm} S	30 _{mm} S	18 _{mm} S	16 _{mm} S	14 _{mm} I	26 _{mm} S	30 _{mm} S	26 _{mm} S	S
CA14	18 _{mm} S	28 _{mm} S	26 _{mm} S	22 _{mm} S	REP	14 _{mm} S	16 _{mm} I	24 _{mm} S	18 _{mm} S	24 _{mm} S	22 _{mm} S	16 _{mm} I	18 _{mm} S	12 _{mm} I	29 _{mm} S	26 _{mm} S	24 _{mm} S	S
CA17	21 _{mm} S	21 _{mm} S	29 _{mm} S	24 _{mm} S	S	13 _{mm} S	25 _{mm} S	27 _{mm} S	26 _{mm} S	24 _{mm} S	30 _{mm} S	15 _{mm} I	15 _{mm} S	13 _{mm} I	27 _{mm} S	27 _{mm} S	21 _{mm} S	S
CA26	21 _{mm} S	20 _{mm} S	27 _{mm} S	23 _{mm} S	S	13 _{mm} S	16 _{mm} I	22 _{mm} S	26 _{mm} S	22 _{mm} S	24 _{mm} S	16 _{mm} I	15 _{mm} S	13 _{mm} I	25 _{mm} S	27 _{mm} S	22 _{mm} S	S
CA26 _{api}	21 _{mm} S	22 _{mm} S	27 _{mm} S	23 _{mm} S	S	13 _{mm} S	20 _{mm} S	24 _{mm} S	28 _{mm} S	25 _{mm} S	28 _{mm} S	17 _{mm} S	15 _{mm} S	13 _{mm} I	28 _{mm} S	27 _{mm} S	24 _{mm} S	S
CA35	24 _{mm} S	22 _{mm} S	26 _{mm} S	24 _{mm} S	REP	14 _{mm} S	24 _{mm} S	26 _{mm} S	28 _{mm} S	24 _{mm} S	28 _{mm} S	18 _{mm} S	16 _{mm} S	14 _{mm} I	26 _{mm} S	30 _{mm} S	26 _{mm} S	S
CA38	18 _{mm} S	20 _{mm} S	24 _{mm} S	24 _{mm} S	REP	12 _{mm} S	14 _{mm} I	24 _{mm} S	26 _{mm} S	20 _{mm} S	22 _{mm} S	16 _{mm} I	14 _{mm} I	12 _{mm} I	26 _{mm} S	22 _{mm} S	22 _{mm} S	S
CA53	R	R	13 _{mm} R	22 _{mm} S	R	14 _{mm} S	9 _{mm} S	24 _{mm} S	28 _{mm} S	R	21 _{mm} S	17 _{mm} S	15 _{mm} S	14 _{mm} I	26 _{mm} S	28 _{mm} S	25 _{mm} S	S
CA59	R	R	26 _{mm} S	23 _{mm} S	S	12 _{mm} S	R	R	27 _{mm} S	R	22 _{mm} S	17 _{mm} S	15 _{mm} S	12 _{mm} I	R	R	R	R
PA37	20 _{mm} S	20 _{mm} S	24 _{mm} S	22 _{mm} S	REP	12 _{mm} S	R	24 _{mm} S	30 _{mm} S	20 _{mm} S	30 _{mm} S	16 _{mm} I	16 _{mm} S	12 _{mm} I	20 _{mm} I	22 _{mm} S	24 _{mm} S	S

PA56	22 _{mm} S	20 _{mm} S	24 _{mm} S	18 _{mm} S	REP	12 _{mm} S	R	24 _{mm} S	26 _{mm} S	22 _{mm} S	26 _{mm} S	16 _{mm} I	14 _{mm} I	14 _{mm} I	24 _{mm} S	24 _{mm} S	24 _{mm} S	S
PA56L-	20 _{mm} S	18 _{mm} S	30 _{mm} S	22 _{mm} S	REP	12 _{mm} S	22 _{mm} S	26 _{mm} S	30 _{mm} S	24 _{mm} S	26 _{mm} S	18 _{mm} S	16 _{mm} S	16 _{mm} S	26 _{mm} S	26 _{mm} S	26 _{mm} S	S
PA58	18 _{mm} S	20 _{mm} S	28 _{mm} S	20 _{mm} S	REP	14 _{mm} S	24 _{mm} S	26 _{mm} S	28 _{mm} S	24 _{mm} S	24 _{mm} S	16 _{mm} I	16 _{mm} S	14 _{mm} I	28 _{mm} S	26 _{mm} S	26 _{mm} S	S
PA8g	18 _{mm} S	17 _{mm} I	29 _{mm} S	18 _{mm} S	R	14 _{mm} S	16 _{mm} I	24 _{mm} S	23 _{mm} S	21 _{mm} S	27 _{mm} S	17 _{mm} S	17 _{mm} S	11 _{mm} R	27 _{mm} S	27 _{mm} S	23 _{mm} S	S
PA8p	R	14 _{mm} I	15 _{mm} I	24 _{mm} S	R	14 _{mm} S	18 _{mm} S	25 _{mm} S	26 _{mm} S	R	27 _{mm} S	16 _{mm} I	15 _{mm} S	12 _{mm} I	26 _{mm} S	27 _{mm} S	25 _{mm} S	S
PAR24	22 _{mm} S	19 _{mm} S	30 _{mm} S	21 _{mm} S	S	14 _{mm} S	23 _{mm} S	26 _{mm} S	28 _{mm} S	24 _{mm} S	28 _{mm} S	17 _{mm} S	17 _{mm} S	15 _{mm} S	28 _{mm} S	28 _{mm} S	24 _{mm} S	S
PAR34	21 _{mm} S	21 _{mm} S	28 _{mm} S	25 _{mm} S	S	14 _{mm} S	20 _{mm} S	27 _{mm} S	23 _{mm} S	23 _{mm} S	27 _{mm} S	16 _{mm} I	16 _{mm} S	14 _{mm} I	30 _{mm} S	28 _{mm} S	25 _{mm} S	S

S – sensível; I- intermediário; R- resistent

ANEXO K – Resultado da determinação dos antígenos O e H, em Laboratório de referência (STATENS SERUM INSTITUT – Department of Microbiology & Infection Control - Copenhagen)

C NUMBER	Original number	SEROTYPE	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>vtx2f</i>	<i>eae</i>	PGUA	HLY
C1176-15	Roxane		-	-	-	+	+	ND

PGUA (DIR 2270):

β-glucuronidase

HAEMOLYSIS (HLY) (DIR 2271):

Haemolysin

O TYPING (DIR 2452)

O*: The O antigen cannot be determined.

H TYPING (DIR 2540)

H*: Non motile.

DNA probes:

eae: CVD434. *E. coli* attaching and effacing gene probe.

vtx1: NTP705. Verotoxin 1; Almost identical with the Shiga toxin.

vtx2: DEP28. Verotoxin 2; Variants exist. Approx. 60% homology to *vtx1*.

vtx2f: PCR fragment amplified from SSI clinical isolate C 548-06, serotype O145:H34 using primers F4f/R1-ef (1)

ANEXO L – Teste Bioquímico

Teste Bioquímico											
		EPM					MILi				
Nº da amostra	LAC	GLI	Gás	LTD	Ure	H2S	MOT	IND	LIS	CIT	Bactéria
CA 04	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	E. coli 616
CA 09	+	+	+	-	-	-	+/-	+	+	-	E. coli 616
CA 11	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	E. coli 416
CA 11A	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	E. coli 616
CA 12	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	E. coli 616
CA 14	+	+	+	-	-	-	+/-	+	+	-	E. coli 616
CA 17	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	E. coli 616
CA 26	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	E. coli 616
*CA 26 (rós)	+	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+	-	E. coli 616
CA 35	+	+	+	-	-	-	-/+	+	+	-	E. coli 606
CA 38	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	E. coli 416
CA 53	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	E. coli 616
CA 54	+	+	+/+	-	-	-	+	+	+	-	E. coli 616
PA R 08	+p	+	-	-	-	-	+	+	+	-	E. coli 416
PA R 08	+g	+	-	-	-	-	+/-	+	+	-	E. coli 416
PA R 24	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	E. coli 416
PA R 34	L+	+	+	-	-	-	+/-	+	+	-	E. coli 616
**PA R 34	L-	+	+	-	-	-	+	-	-/+	+	C. freundii 211
PA R 37	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	E. coli

											406
PA R 56	L+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	E. coli 606
PA R 56	L-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	E. coli 406
PA R 58	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	E. coli 406

*Api20E **C. freundii

ANEXO M – Ensaio com cristal de Violeta – Formação de Biofilme

Resultados da leitura de absorbância a 595nm												
Amostra	06/01/16				14/01/16			21/01/16		Média	Desv. Pad	Teste T
c- (LB)	0,077				0,064			0,067		0,069	0,035	
042 (c+)	0,684	0,482	0,634	0,494	0,771	1,209	1,413	0,995	0,733	0,824	0,398	
DH5α (c-)	0,027	0,012	0,050	0,026	0,020	0,020	0,032	0,019	0,018	0,025	0,013	
CA12	0,000	0,000	0,000	0,026	0,036	0,047	0,081	0,032	0,077	0,033	0,031	0,495
CA14	0,006	0,003	0,028	0,024	0,046	0,060	0,005	0,010	0,012	0,022	0,020	0,668
CA35	0,060	0,021	0,029	0,025	0,495	0,071	0,062	0,010	0,045	0,091	0,147	0,237
PAR8g	0,064	0,058	0,047	0,045	0,045	0,052	0,035	0,056	0,084	0,054	0,022	0,003
PAR24	0,024	0,055	0,075	0,031	0,026	0,041	0,043	0,075	0,065	0,048	0,024	0,010
PAR56L+	0,026	0,067	0,090	0,086	0,047	0,047	0,024	0,016	0,046	0,050	0,030	0,016
PAR56L-	0,010	0,013	0,054	0,034	0,038	0,031	0,029	0,030	0,053	0,032	0,018	0,154
PAR58	0,013	0,056	0,050	0,020	0,023	0,030	0,008	0,008	0,032	0,027	0,018	0,795

ANEXO N – Solução tampão cacodilato de sódio a 0,2 M - pH 7,2 (estoque)

O cacodilato de sódio foi dissolvido em água bidestilada e o pH ajustado com HCl a 0,2 M. A solução final foi conservada a 4°C.

Para as lavagens, durante o processamento do material para microscopia eletrônica, esta solução foi utilizada na concentração de 0,1 M.

Solução fixadora

Glutaraldeído 2,5 %.....	30 mL
Tampão Fostato 0,2	0,1 M
Água destilada.....	120 mL
Volume final.....	300 mL

Esta solução foi utilizada para a fixação de amostras a serem analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV). A solução foi preparada no momento do uso.

Tetróxido de ósmio a 4%

Uma grama de tetróxido de ósmio (EMS - Electron Microscopy Sciences, Inc., USA) foi cuidadosamente dissolvida em um frasco escuro contendo 25 mL de água destilada (procedimento realizado dentro da capela). A preparação foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente, durante 24 horas, a fim de permitir a dissolução completa dos cristais. Após este período, a solução foi armazenada a 4°C. No momento do uso, esta solução foi diluída a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M.

Araldite-502

Araldite	30 g
Anidrido dodenil succínico (DDSA)	23,4 g
2,4,6 – {Tri (Dimetilaminoetil) fenol} (DMP-30)	0,81 g

Obs.: Quantidade para o preparo de aproximadamente 40 mL de resina.

O Araldite e o DDSA foram misturados lentamente, evitando-se a formação de bolhas de ar. Esta preparação foi alíquotada em seringas plásticas e armazenada a 4°C. No momento do uso, após atingir a temperatura ambiente, esta preparação foi acrescida de DMP-30.

Acetato de uranila aquosa a 2%

No preparo desta solução, 2 g de acetato de uranila foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. A solução foi filtrada e armazenada, em frasco escuro, à temperatura ambiente.

Citrato de chumbo

Nitrato de chumbo	1,33 g
Citrato de sódio	1,76 g
Água destilada fervida e resfriada	100mL

O nitrato de chumbo e o citrato de sódio foram inicialmente dissolvidos em 30mL de água destilada (fervida e resfriada imediatamente antes do preparo desta solução), em um balão volumétrico. A preparação foi vigorosamente agitada durante 5 minutos e posteriormente, e agitada moderadamente durante mais 30 minutos, até a dissolução completa dos reagentes e a formação de uma solução leitosa. Uma solução de NaOH a 1 M, preparada no momento do uso, foi adicionada à preparação, até que esta se tornasse transparente. Em seguida, adicionou-se um volume de água destilada suficiente para se completar 50 mL de solução. Esta solução foi mantida no mesmo frasco, em descanso, por pelo menos um dia antes de ser utilizada.

ANEXO O

ANEXO P

Compilação dos resultados (menor aumento)

ANEXO Q

Compilação dos resultados (maior aumento)